

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT

MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND  
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT

**Geeniekspressiooni muutused fibroblastides tsütokiinide korduval toimel**

Bakalaureusetöö  
Geenitehnoloogia õppekava  
12 EAP  
Katrina Ahun

Juhendajad    MSc, Epp Kaleviste  
PhD, Tõnis Org

TARTU 2020

## **Geeniekspressiooni muutused fibroblastides tsütokiinide korduval toimel**

Tsütokiinid on leukotsüütide ja teiste rakkude poolt sünteesitavad valgulised signaalmolekulid, mis omavad rolli põletiku ja immuunvastuse reguleerimisel ning samuti kudede kahjustuse tekkel ja paranemisel. Tsütokiinide seondumisel rakupinna retseptorile järgneb rakusisesel signaaliraja aktiveerumine, transkriptsioonifaktorite seondumine geenide promootoritele ja geeniekspressiooni vallandumine. Loomuliku immuunsuse rakkude puhul on täheldatud geeniekspressiooni profiili muutumist põletiku tingimustes. Sõltuvalt tsütokiinist võib stimulatsioonile järgneda kas geeniekspressiooni võimendumine või pidurdumine. Lisaks loomuliku immuunsuse rakkudele osalevad põletikuvastuses ka fibroblastid, mille tuntuim ülesanne on kudede tugistruktuuride moodustamine. Fibroblastide rolli põletikuvastuse moduleerimisel on vähe uuritud. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida, kas fibroblastide korduval stimulatsioonil IFN- $\alpha$ , IL-6 ning TNF- $\alpha$  tsütokiinidega muutuvad geeniekspressiooni tasemed võrreldes esmase stimulatsiooniga.

**Märksõnad:** fibroblastid, tsütokiinid, põletik, immuunsüsteem

**CERCS:** B500 Immunoloogia, seroloogia, transplantoloogia

## **Gene expression changes in fibroblasts during repeated stimulation with cytokines**

Cytokines are proteins that function as signalling molecules and are produced by leukocytes and other cells. They play a crucial part in inflammation and immune regulation as well as tissue damage and repair. After cytokines bind to its receptor, the signalling pathways are activated inside the cell, transcription factors bind to the promoters of the target gene and gene expression is initiated. While studying innate immune cells, it has been reported, that in an inflammatory environment the gene expression profiles are changing. Depending on the cytokine gene expression is either upregulated or downregulated during a subsequent stimulation. In addition to the innate immune system cells, fibroblasts also take part in inflammation regulation. Their most well-known role is forming tissue support structures, but their role in inflammation regulation has not yet been widely studied. The goal of this thesis is to study whether repeated stimulation of fibroblasts with cytokines change gene expression levels compared to the initial stimulation.

**Keywords:** fibroblasts, cytokines, inflammation, immune system

**CERCS:** B500 Immunology, serology, transplantation

# SISUKORD

KASUTATUD LÜHENDID.....	5
SISSEJUHATUS.....	7
1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE.....	8
1.1 Põletik.....	8
1.1.1 Põletikuvastuse 4 etappi.....	8
1.2 Tsütokiinid.....	9
1.2.1 IFN- $\alpha$ .....	10
1.2.2 IFN- $\alpha$ signaalirada.....	11
1.2.3 IL-6.....	13
1.2.4 IL-6 signaalirada.....	13
1.2.5 TNF- $\alpha$ .....	14
1.2.6 TNF- $\alpha$ signaalirada.....	16
1.3 Naha fibroblastid.....	17
2 EKSPERIMENTAALOSA.....	18
2.1 Töö eesmärgid.....	18
2.2 Materjal ja metoodika.....	18
2.2.1 Kasutatud rakuliin.....	18
2.2.2 Rakkude sulatamine, kasvatamine ja külmutamine.....	18
2.2.3 Kasutatud tsütokiinid.....	19
2.2.4 Katseskeem.....	19
2.2.5 RNA eraldamine rakkudest.....	22
2.2.6 cDNA süntees.....	22
2.2.7 Praimerite disainimine.....	22
2.2.8 RT-PCR.....	23
2.2.9 Statistiline analüüs.....	23
2.3 Tulemused.....	24
2.3.1 Tsütokiinide stimulatsioonide optimeerimine.....	24
2.3.2 4- ja 8-päevane IFN- $\alpha$ stimulatsioon.....	26
2.3.3 8-päevane puhkeperioodiga IFN- $\alpha$ stimulatsioon.....	28

2.3.4	4- ja 8-päevane IL-6 stimulatsioon.....	29
2.3.5	8-päevane puhkeperioodiga IL-6 stimulatsioon.....	30
2.3.6	4- ja 8-päevane TNF- $\alpha$ stimulatsioon.....	31
2.3.7	8-päevane puhkeperioodiga TNF- $\alpha$ stimulatsioon.....	33
2.4	Arutelu.....	34
KOKKUVÕTE .....		38
SUMMARY .....		39
TÄNUSÕNAD .....		40
KASUTATUD KIRJANDUS .....		41
KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....		50
LISAD.....		51
LIHTLITSENTS.....		53

## KASUTATUD LÜHENDID

CAM	raku adhesiooni molekul ( <i>cell adhesion molecule</i> )
CSF	kolooniat stimuleeriv faktor ( <i>colony-stimulating factor</i> )
DAMP	kahjustusega seotud molekulaarne muster ( <i>damage-associated molecular pattern</i> )
dsRNA	kaheahelaline RNA ( <i>double-stranded RNA</i> )
GAS	gamma-aktiveeritud järjestus ( <i>gamma-activated sequence</i> )
gp130	glükoproteiin 130 ( <i>glycoprotein 130</i> )
IFN	interferoon ( <i>interferon</i> )
IFN- $\alpha$	interferoon alfa ( <i>interferon alpha</i> )
IFNAR	IFN- $\alpha$ retseptor ( <i>INF-<math>\alpha</math> receptor</i> )
IL	interleukiin ( <i>interleukin</i> )
IL-6	interleukiin 6 ( <i>interleukin 6</i> )
IRF9	interferooni regulaatorfaktor 9 ( <i>interferon regulatory factor 9</i> )
ISG	interferooni stimuleeritud geen ( <i>interferon-stimulated gene</i> )
ISGF3	interferooni stimuleeritud geenifaktor 3 ( <i>interferon-stimulated gene factor 3</i> )
ISRE	interferooni stimuleeritud vastuselement ( <i>interferon-stimulated response element</i> )
JAK1	Janus kinaas 1 ( <i>Janus kinase 1</i> )
JNK	Jun NH <sub>2</sub> terminaalsed kinaas ( <i>Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase</i> )
LPS	lipopolüsahhariid ( <i>lipopolysaccharide</i> )
MAPK	mitogeen-aktiveeritud proteiini kinaas ( <i>mitogen-activated protein kinase</i> )
NHDF	normaalne inimese dermaalne fibroblast ( <i>normal human dermal fibroblast</i> )
NK-rakk	naturaalne tapjarakk ( <i>natural killer cell</i> )
NLR	NOD-tüüpi retseptor ( <i>NOD-like receptor</i> )
NS	mittestimuleeritud proov ( <i>not stimulated</i> )
PAMP	patogeeniga seotud molekulaarne muster ( <i>pathogen-associated molecular pattern</i> )
pDC	plasmatsütoidsed dendriitrakk ( <i>plasmacytoid dendritic cell</i> )
RA	reumatoidartriit ( <i>rheumatoid arthritis</i> )
RT-PCR	pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsioon ( <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> )
SD	standardhälve ( <i>standard deviation</i> )
sIL-6R	lahustuv IL-6 retseptor ( <i>soluble IL-6 receptor</i> )

SLE	süsteemne erütematoosne luupus ( <i>systemic lupus erythematosus</i> )
SOCS	tsütokiini signalisatsiooni supressor ( <i>suppressor of cytokine signalling</i> )
STAT	signaali vahendaja ja transkriptsiooni aktivaator ( <i>signal transducer and activator of transcription</i> )
TLR	Toll-tüüpi retseptor ( <i>Toll-like receptor</i> )
TNF	tuumori nekroosi faktor ( <i>tumour necrosis factor</i> )
TNFR	TNF retseptor ( <i>TNF receptor</i> )
TNF- $\alpha$	tuumori nekroosi faktor alfa ( <i>tumor necrosis factor alpha</i> )
TS	tsütokiiniga stimuleeritud proov
Tyk2	türosiini kinaas 2 ( <i>tyrosine kinase 2</i> )

## SISSEJUHATUS

Tsütokiinid on valgulised signaalmolekulid, mis omavad rolli põletiku ja immuunvastuse reguleerimisel ning samuti kudede kahjustuse tekkel ja paranemisel. Tsütokiine on võimelised tootma mitmed erinevad rakutüübid, nagu näiteks erinevad immuunrakud. Pärast tsütokiini seondumist rakupinna retseptorile järgneb rakusisesel signaaliraja aktiveerumine, transkriptsioonifaktorite seondumine geenide promootoritele ja geeniekspressiooni vallandumine. Põletiku tingimustes on loomuliku immuunsuse rakkude puhul on täheldatud geeniekspressiooni profiili muutumist. Tsütokiinist sõltuvalt võib stimulatsioonijärgselt geeniekspressioon nii võimendada kui ka pidurdada. Põletikuvastuses osalevad lisaks loomuliku immuunsuse rakkudele ka fibroblastid, mille tuntuim ülesanne on kudede tugistruktuuride moodustamine. Nende osaluse tõttu põletikuvastuses ja haavade paranemises, on fibroblaste antud kontekstis oluline uurida. Varasemalt on fibroblastide rolli põletikuvastuse moduleerimisel pigem vähe uuritud. Põletikulised tsütokiinid vahendavad signaali märklaudkudedesse, kus leiavad aset põletikulised protsessid. Interferoon  $\alpha$  (*interferon alpha*, IFN- $\alpha$ ) osaleb viirusevastases võitluses, kuid on samas oluline tsütokiin immuunrakkude aktiveerimises põletikuvastuses. Interleukiin 6 (*interleukin 6*, IL-6) omab kesket rolli põletikureaktsiooni kujunemisel, indutseerides erinevate põletikuliste valkude tootmist ning rakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist. Tuumori nekroosi faktor  $\alpha$  (*tumor necrosis factor alpha*, TNF- $\alpha$ ) on üks tähtsamaid regulaatoreid põletikuvastuses, ekspresseerides ja tootes põletikulisi molekule, indutseerides rakke ning kutsudes esile apoptoosi. Põletikuliste tsütokiinide tasakaalu häire osaleb mitmete krooniliste autoimmuunhaiguste tekkes. Tsütokiinide blokeerimisega on võimalik kroonilisi põletikulisi haigusi ravida, aga raviefekt varieerub ja ravi pole alati edukas.

Kuna tsütokiinide kasutamine ning inhibeerimine ravieesmärgil on üha enam levimas kliinilises praktikas, on oluline teada tsütokiinide toime täpset dünaamikat rakkudes. Käesoleva bakalaureusetöö eesmärgiks on uurida, kas fibroblastide korduval stimulatsioonil IFN- $\alpha$ , IL-6 ning TNF- $\alpha$  tsütokiinidega muutuvad geeniekspressiooni tasemed võrreldes esmase stimulatsiooniga.

Töö eksperimentaalne osa teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas bio- ja siirdemeditsiini instituudis molekulaarpatoloogia uurimisrühmas.

# 1 KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Põletik

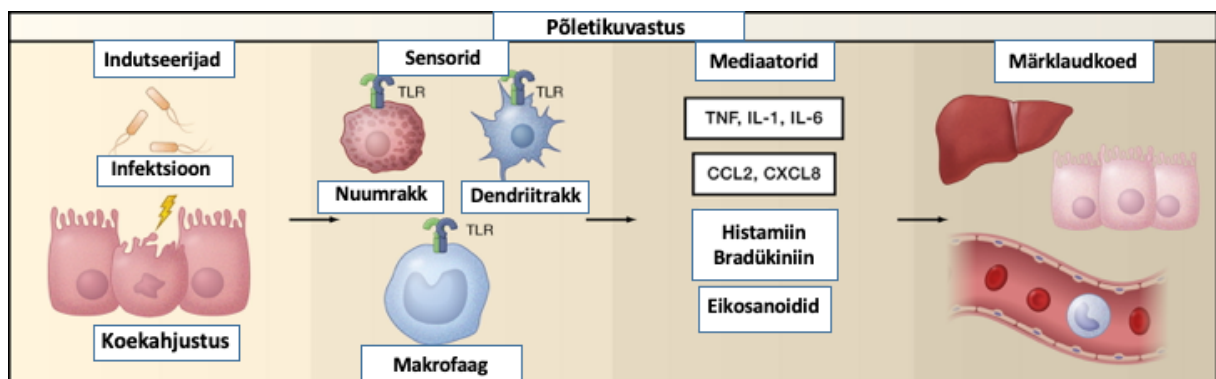
Põletik on organismi reaktsioon koe kahjustuse korral (Alessandri et al., 2013). Põletikku võivad tekitada koe füüsiline kahjustus, koe stress, infektsioon, toksiinid vms (Barton, 2008). Põletikuvastus tekitab organismis rakulisi muutusi ja immuunvastust, mille tulemusena koekahjustus parandatakse ning rakud prolifereeruvad kahjustuse kohas (Medzhitov, 2010). Põletik võib muutuda krooniliseks, kui põletiku põhjustajat ei suudeta pidurdada. Krooniliste põletikuliste haiguste hulka kuuluvad näiteks psoriaas, astma, süsteemne erütematoosne luupus (*systemic lupus erythematosus*, SLE) ja reumatoidartriit (*rheumatoid arthritis*, RA) (Alessandri et al., 2013; Boehncke, 2018; Chung, 2012; Moulton et al., 2017; Waldburger ja Firestein, 2009).

### 1.1.1 Põletikuvastuse 4 etappi

Põletikuvastus koosneb neljast etapist – põletiku indutseerijad, sensorid, mediaatorid ning märklaudkoed (joonis 1). Põletiku indutseerijateks võivad olla viirused, mikroorganismid, mehhaanilised kahjustused kudede või kudede stress (Barton, 2008; Medzhitov, 2010) (joonis 1). Indutseerijateks on kahjustusega seotud molekulaarne muster (*damage-associated molecular pattern*, DAMP) ja patogeeni seotud molekulaarne muster (*pathogen-associated molecular pattern*, PAMP), mis toimivad organismis ohusignaalina (Strbo et al., 2014). DAMP-d on molekulidel, mis on vabanenud rakus stressiga, nagu näiteks rakusisesed valgud, DNA ja RNA. PAMP-d on patogeeni spetsiifilised molekulid, nagu bakteriaalselt päritolu lipopolüsahhariidid (*lipopolysaccharide*, LPS) või polünukleotiidid (Strbo et al., 2014). Neid ohusignaale tunnevad organismis ära keratinotsüüdid, makrofaagid, dendriitrakud ja nuumrakud (Medzhitov, 2008) (joonis 1). Antud rakkudel on selle jaoks spetsiifilised sensorid ehk retseptorid, nagu Toll-tüüpi retseptorid (*Toll-like receptor*, TLR) ja NOD-tüüpi retseptorid (*NOD-like receptor*, NLR). Sensorid annavad edasi signaali, mis indutseerib mediaatorite tootmist. Mediaatoriteks võivad olla näiteks tsütokiinid, kemokiinid ja ka muud erinevad molekulid (Medzhitov, 2010). Mediaatorid vahendavad signaali märklaudkudedesse, kus leiavad aset põletikulised muutused (joonis 1). Kudedes laienevad veresooned ning toimub massiline leukotsüütide, monotsüütide ja neutrofiilide liikumine põletikukoldesse (Barton, 2008; Nathan, 2006) (joonis 1). Kemokiinid indutseerivad adhesioonimolekulide ekspressiooni endoteeli rakkudes. Selle tulemusena liiguvad neutrofiilid mööda endoteeli rakke



põletikukoldesse. Neutrofiilid migreeruvad kõrge kemokiini kontsentratsiooni suunas (Vestweber, 2015). Neutrofiilid eemaldavad patogeene ja rakujäägid fagotsütoosi kaudu (Wilgus et al., 2013). Neutrofiilid toodavad samuti tsütokiine, mis võimendavad omakorda põletikuvastust. Lisaks produtseerivad neutrofiilid antimikroobseid peptiide (Eming et al., 2014). Samuti migreeruvad koldesse monotsüüdid, mis diferentseeruvad makrofaagideks (Galli et al., 2011). Makrofaagid fagotsüteerivad mikroobe ning rakujääke ja toodavad põletikulisi mediaatoreid. Hiljem omandavad makrofaagid ka kude parandava rolli, produtseerides põletikuvastaseid mediaatoreid ning kasvufaktoreid (Galli et al., 2011).



**Joonis 1. Põletikuvastuse etapid.** Põletikuvastus koosneb indutseerijatest, mis algatavad esialgse immuunreaktsiooni. Indutseerijad annavad signaali edasi sensoritele, mida ekspresseeritakse nuum- ja dendriitrakkudel ning makrofaagidel. Sensorid indutseerivad mediaatorite tootmist, milleks võivad olla kemokiinid, tsütokiinid, histamiin, bradükiniin ning eikonasoidid (prostaglandiinid). Mediaatorid algatavad märklaukudes erinevaid põletikulisi muutuseid (kohandatud Medzhitov, 2010).

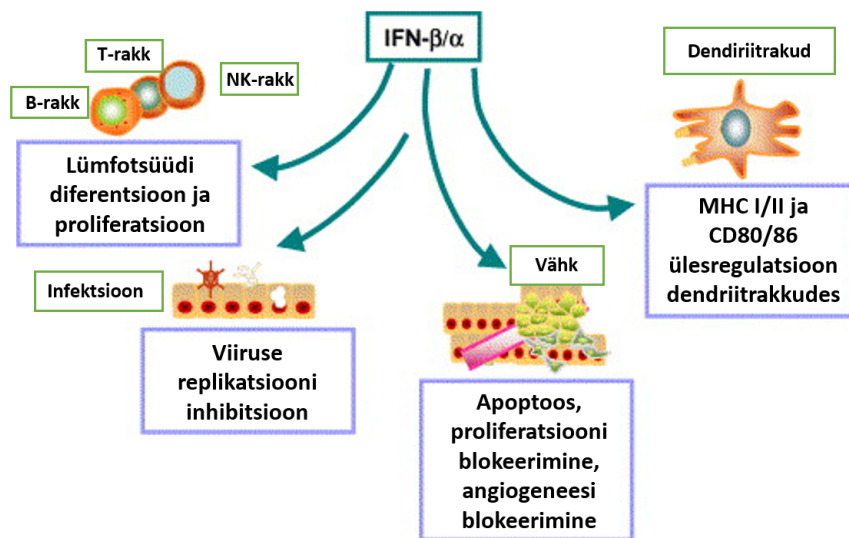
## 1.2 Tsütokiinid

Tsütokiinid on väikesed signaalmolekulid, mille peamine ülesanne on rakkudevaheline kommunikatsioon. Tsütokiinid tagavad immuunsüsteemi ja teiste organisüsteemide omavahelise suhtluse ning kontrollivad erinevaid protsesse immuunsüsteemis (Whiteside, 1994). Tsütokiinid omavad olulist rolli immuunsüsteemi kaitses – organismi vastus infektsioonile, immuunreaktsioon, trauma, põletik, kasvaja vms (Chow et al., 2001; Goodbourn et al., 2000; Hansen et al., 2008; Idriss ja Naismith, 2000; Wang et al., 2005, 2009). Tsütokiinid reguleerivad rakkude diferentseerumist, proliferatsiooni ning reageerimist ümbritseva suhtes (Whiteside, 1994). Antud signaalmolekulid suudavad omakorda indutseerida või inhibeerida ka ennast või teisi tsütokiine (Whiteside, 1994). Pea kõik tuumaga rakud on võimelised tsütokiini tootma ja nendele vastama (Dinarello, 2000). Ühte konkreetset tsütokiini

võivad toota erinevat tüüpi rakud (Whiteside, 1994). Tsütokiinid edastavad signaali seondudes rakkude plasmamembraanil paiknevate retseptoritega. Antud retseptoreid on raku kohta enamasti ainult mõnesajast mõne tuhandeni (Foxwell et al. 2008). Üks võimalik tsütokiinide klassifitseerimise viis on interleukiinid, IFN-d, TNF-d, kolooniat stimuleerivad faktorid (*colony-stimulating factor*, CSF), kemokiinid ning kasvufaktorid. Interleukiinidel on mitmeid erinevaid funtsioone, näiteks osalevad need lümfotsüüdi arengus (Wang et al., 2005), põletiku soodustamisel ning inhibeerimisel (Boraschi ja Tagliabue, 2013). IFN-d on võimelised inhibeerima viiruste replikatsiooni ning infektsiooni (Moore et al., 2001). TNF perekonda kuuluvad inflammatoorsed tsütokiinid (Idriss ja Naismith, 2000). CSF-d stimuleerivad rakkude proliferatsiooni ning diferentseerumist (Hansen et al., 2008). Kemokiinid on olulised põletikukoldesse rakkude värbamisel (Cascieri ja Springer, 2000) ning kasvufaktorid stimuleerivad rakkude kasvu (Hajimiri et al., 2015). Antud töös on keskendutud tsütokiinidele, mis omavad olulist rolli põletikureaktsioonis – IFN- $\alpha$ , IL-6 ja TNF- $\alpha$ .

### 1.2.1 IFN- $\alpha$

IFN- $\alpha$  kuulub I tüüpi interferoonide hulka, mis on tuntud antiviraalse funktsiooni poolest (Moore et al., 2001). Kaheaheelaline RNA (*double-stranded RNA*, dsRNA) stimuleerib kõige tugevamalt rakke tootma I tüüpi interferoone (Kawai ja Akira, 2010). IFN- $\alpha$ -t produtseerivad peamiselt plasmatsütoidsed dendriitrakud (*plasmacytoid dendritic cell*, pDC) (Megjugorac et al., 2004). Lisaks viirusevastasele toimele reguleerib IFN- $\alpha$  nii kaasasündinud kui ka omandatud immuunsuse mehhanisme, toimides kas kaudselt või otseselt naturaalselele tapjarakkudele (*natural killer cell*, NK-rakk), T-rakkudele, B-rakkudele, dendriitrakkudele ja fagotsütaarsetele rakkudele (Prchal et al., 2009) (joonis 2). IFN- $\alpha$  osaleb põletikulistes protsessides, aktiveerides immuunrakke. Antud tsütokiin indutseerib rakkude apoptoosi ning dendriitrakkude arengut ja blokeerib rakkude proliferatsiooni ning angiogeneesi (Solis et al., 2006) (joonis 2). Tsütokiinide häiritud või liigne tootmine võib viia mitmete põletikuliste haiguste ning kasvajate tekkeni (Bradley, 2008; Taniguchi ja Karin, 2014). IFN- $\alpha$  liigne tootmine on seotud haigustega SLE ja RA ning süsteemne skleroos. Hetkel on arengujärgus mitmed IFN- $\alpha$ -t, IFN- $\alpha$  retseptorit (*INF- $\alpha$  receptor*, IFNAR) või pDC rakke inhibeerivad ravimid (Chyuan et al., 2019; Kirou ja Gkrouzman, 2013). Samas kasutatakse IFN- $\alpha$ -t näiteks C-hepatiidi ja kasvatajate raviks, kuid kõrvalnähtude tõttu peab olema ettevaatlik antud tsütokiini kasutamisel meditsiinilistel eesmärkidel (Basyte-Bacevice ja Kupcinskas, 2020; Palata et al., 2019).

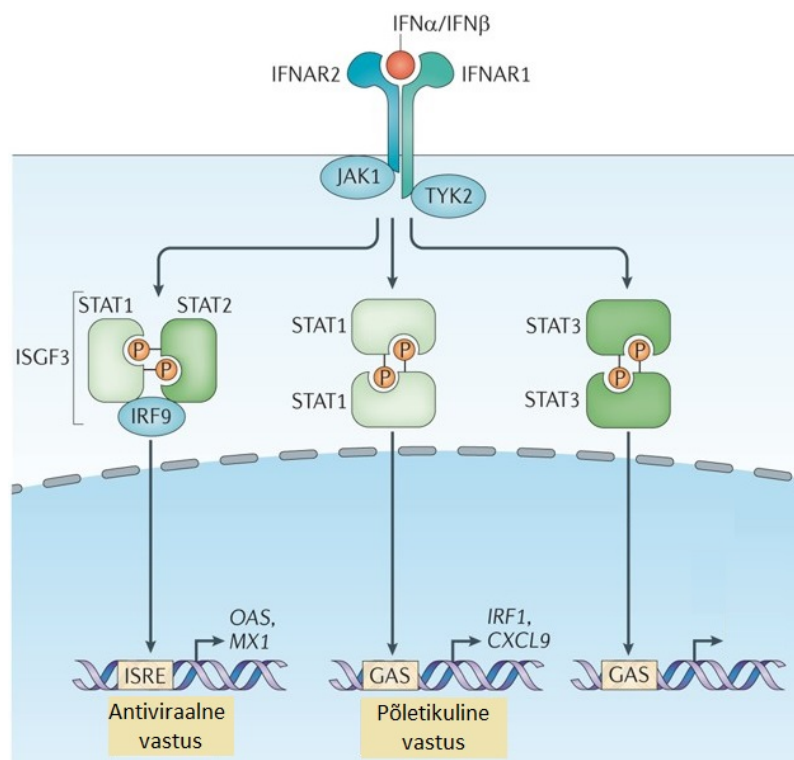


**Joonis 2. IFN- $\alpha$  funktsioonid.** IFN- $\alpha$  omab olulist rolli viirusvastases kaitses ja immuunvastuses. IFN- $\alpha$  mõjutab immuunrakkude diferentseerumist ja arengut. Antud tsütokiin indutseerib dendriitrakkude arengut MHC klass I/II ja CD80/60 ülesreguleerimisega ning abistab ka B-, T- ja NK-rakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist. Lisaks sellele võib IFN- $\alpha$  vajadusel viia rakke apoptoosi ning blokeerida ka proliferatsiooni ja angiogeneesi (kohandatud Solis et al., 2006).

### 1.2.2 IFN- $\alpha$ signaalirada

I tüüpi interferoonid seonduvad transmembraansele IFNAR-le. IFNAR on heterodimeer ning koosneb IFNAR1 ja IFNAR2 subühikutest (Ivashkiv ja Donlin, 2014). Kui IFN- $\alpha$  on retseptorile seondunud, aktiveeruvad Janus kinaas 1 (*Janus kinase 1*, JAK1) ning türosiini kinaas 2 (*tyrosine kinase 2*, Tyk2). Kinaasid fosforüleerivad signaali vahendaja ja transkriptsiooni aktivaatori (*signal transducer and activator of transcription*, STAT) valke, mis moodustavad dimeeri. Fosforüleeritud dimeer translokeerub tuuma ja seostub märklaudgeeni ehk interferooni stimuleeritud geeni (*interferon-stimulated gene*, ISG) promootoralale, aktiveerides geeni ekspressiooni (joonis 3) (Ivashkiv ja Donlin, 2014; Levy ja Darnell, 2002; Stark ja Darnell, 2012). IFN- $\alpha$  aktiveerib enamasti STAT1/STAT2 heterodimeeri moodustumist, kuid samamoodi on võimalikud nii STAT1 homodimeeri, STAT3 homodimeeri kui ka STAT1/STAT3 heterodimeeri moodustumine (Thyrell et al., 2007). STAT1 ja STAT2 fosforüleerimisel assotsieerub heterodimeer valguga interferooni regulaatorfaktor 9 (*interferon regulatory factor 9*, IRF9), moodustades kompleksi interferooni stimuleeritud geenifaktor 3 (*interferon-stimulated gene factor 3*, ISGF3) (Platanias, 2005). ISGF3 kompleks seondub interferooni stimuleeritud vastuselemendile (*interferon-stimulated response element*, ISRE),

mis aktiveerib antiviraalseid geene (Platanias, 2005). STAT1 homodimeer aga seondub gamma-aktiveeritud järjestusele (*gamma-activated sequence*, GAS), mis indutseerib nii põletikuvastuses kui ka muudes protsessides osalevaid märklaugeene (Platanias, 2005). STAT3 homodimeer seondub samuti GAS järjestusele, aktiveerides teatud märklaugeene, mis võivad olla jagatud STAT1-ga (Thyrell et al., 2007) (joonis 3) (Ivashkiv ja Donlin, 2014). JAK-STAT raja terminatsiooni ja efektiivsust reguleerivad tsütokiini signalisatsiooni supressorid (*suppressor of cytokine signalling*, SOCS) (C. D. Chung et al., 1997; Seif et al., 2017). SOCS1 ja SOCS3 valgud reguleerivad negatiivselt JAK-STAT rada (Trenkove ja Ward, 2013). Lisaks JAK-STAT rajale aktiveerib IFN- $\alpha$  ka NF- $\kappa$ B (Du et al., 2007) ja mitogeen-aktiveeritud proteiini kinaasi (*mitogen-activated proteiin kinase*, MAPK) (Zhao et al., 2011) radasid, kuid need on vähem uuritud. Antud töös uuriti IFN- $\alpha$  märklaugeene *IFIT1*, *IFI44L*, *RSAD2* ja *CXCL10*. IFIT1 ning RSAD2 omavad erinevaid viirusevastaseid mehhanisme (Schneider et al., 2014). IFI44L-l on küll antiviraalsed omadused, kuid lisaks moduleerib see negatiivselt viirusinfektsioonile järgnevat immuunvastust (DeDiego et al., 2019). CXCL10 on kemokiin, mis on kemoatraktant aktiveeritud T-rakkudele (Dufour et al., 2002).



**Joonis 3. Tüüp I interferoonide signaalirada.** IFN- $\alpha$  seondumisel aktiveerib IFNAR kinaasid JAK1 ja Tyk2. Kinaasid fosforüleerivad STAT valgud, mille tulemusena moodustuvad kas STAT1 homodimeer, STAT3 homodimeer, STAT1/STAT3 heterodimeer või STAT1/STAT2 heterodimeer. STAT1 ja STAT2 dimeer assotsieerub valguga IRF9, moodustades kompleksi ISGF3. ISGF3 kompleks seondub ISRE-le, mis aktiveerib antiviraalse vastuse. STAT1

homodimeer aga seondub GAS-le, mis aktiveerib põletikuvastuse. STAT3 homodimeer seondub samuti GAS-le (kohandatud Ivashkiv ja Donlin, 2014).

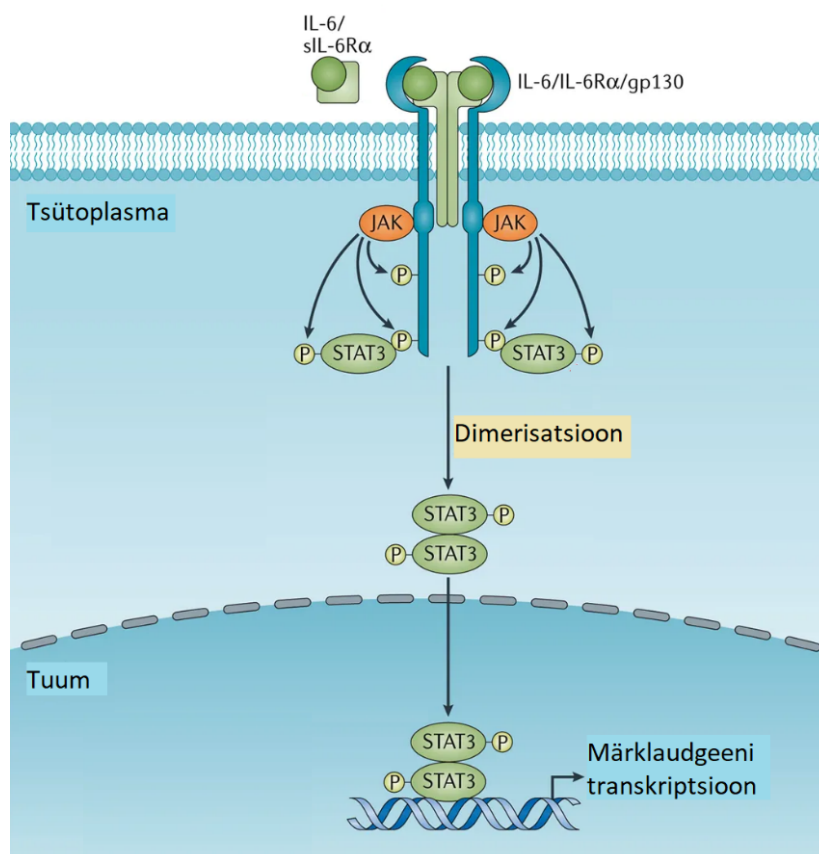
### 1.2.3 IL-6

IL-6 osaleb mitmes erinevad protsessis, nagu immuun- ja põletikuvastus, rakukasv, diferentseerumine, migratsioon jpm (Garbers et al., 2012). IL-6 toodavad mitmed erinevad rakutüübid. Lisaks immuunrakkudele – makrofaagid, monotsüüdid ja T-rakud, võivad IL-6 toota ka fibroblastid, endoteelirakud, nuumrakud ja mitmed kasvajakuliinid (Snick, 1990; Tanaka et al., 2014). IL-6 keskne roll on immuunvastuse ja põletikureaktsiooni kujunemisel, lisaks osaleb ta mitmete rakkude arengus, nagu näiteks hepatotsüüdid, luuüdi vereliistakud ja fibroblastid (Tanaka et al., 2014). IL-6 sünteesitakse põletiku algfaasides, kus ta indutseerib erinevate akuutse faasi valkude tootmist, mis osalevad turses, põletikulises aneemias ja kardiovaskulaarsetes haigustes (Heinrich et al., 1990). Lisaks võib IL-6 indutseerida ka mitte-immuunrakkude proliferatsiooni ja diferentseerumist (Tanaka et al., 2014). IL-6 on väga oluline Th17 rakkude (Korn et al., 2009) ning tsütotoksiliste T-rakkude (Bettelli et al., 2006) diferentseerumiseks naiivsetest T-rakkudest. IL-6 on seotud mitmete krooniliste põletikuliste ja autoimmuunhaigustega, mistõttu on IL-6 ja tema retseptorit blokeerivate ravimite uuringud väga levinud. IL-6 vastaseid monoklonaalseid antikehasid kasutatakse näiteks reumatoidartriidi raviks (Choy et al., 2020).

### 1.2.4 IL-6 signaalirada

IL-6 perekonna tsütokiinid vajavad signaali edastamiseks glükoproteiin 130 (*glycoprotein 130*, gp130) subühikut ning IL-6 retseptorit ehk IL-6R, millele IL-6 saab seonduda. IL-6R ise signaali edasikandmises ei osale. IL-6/IL-6R kompleks seondub gp130-ga, mis viib gp130-homodimeeri moodustumiseni ning signaaliülekanzeni (Scheller et al., 2006). Kuigi vaid mõned rakud ekspresseerivad IL-6 retseptorit, siis on võimalik kõiki rakke stimuleerida lahustuva IL-6 retseptoriga (*soluble IL-6 receptor*, sIL-6R) (Scheller et al., 2011). Antud töös on kasutatud sIL-6R molekuli IL-6-ga stimuleerimisel. IL-6 signaaliülekanne toimub JAK-STAT raja kaudu, nagu ka IFN- $\alpha$  puhul (Guo et al., 2012; Imada ja Leonard, 2000). Kinaasid JAK1, JAK2 ja Tyk2 aktiveeritakse IL-6 kompleksiga kokkupuutel (Calò et al., 2003), mis omakorda fosforüleerivad STAT3 valgud. Aktiveeritud STAT3 homodimeer translokeerub tsütoplastmast rakutuuma, kus ta seondub promootorile ja algatab erinevate geenide

transkriptsiooni (Levy ja Lee, 2002) (joonis 4). Antud tsütokiini aktiveeritud JAK-STAT signaalirada inhibeervad SOCS valgud, nagu ka IFN- $\alpha$  raja puhul (Tanaka et al., 2014). IL-6 on võimeline lisaks JAK-STAT radadele aktiveerima ka teisi radu, mille hulka kuuluvad ka NF- $\kappa$ B ja MAPK rajad (Luo ja Zheng, 2016). IL-6 märklaudgeenidena on antud töös kasutatud *MCPI*, mille rolliks on monotsüütide ja makrofaagide migratsiooni ja infiltratsiooni regulatsioon (Deshmane et al., 2009), ning *SOCS3*, mis inhibeering JAK-STAT signaalirada (Trengeve ja Ward, 2013).

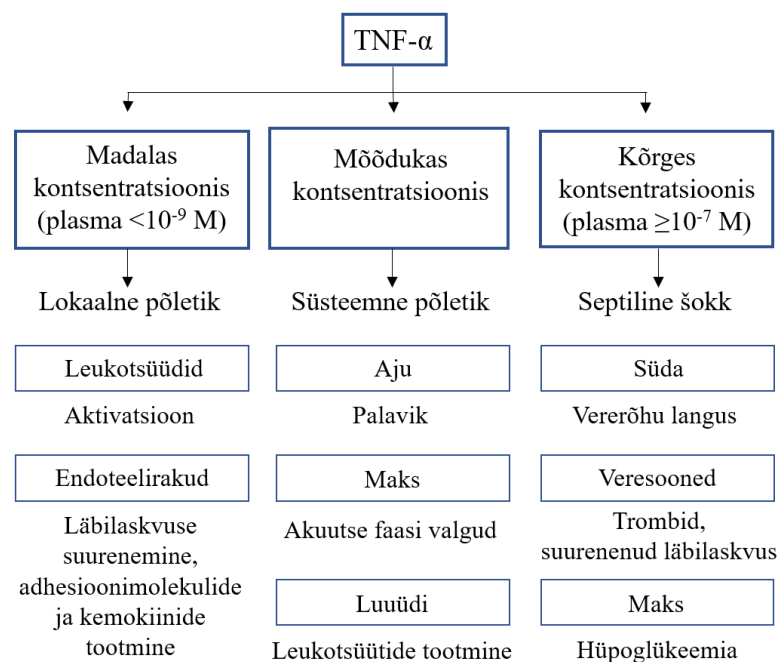


**Joonis 4. IL-6 JAK-STAT signaalirada.** IL-6 seondub sIL-6R ja gp130-ga. Moodustunud kompleks indutseerib JAK kinaasi fosforüülimise, mis viib STAT3 dimeeri aktivatsioonini. Fosforüleeritud STAT3 dimeer liigub tuuma, kus ta algatab erinevate märklaudgeenide transkriptsiooni (kohandatud Johnson et al., 2018).

### 1.2.5 TNF- $\alpha$

TNF- $\alpha$  on proinflammatoorne tsütokiin, mis on võimeline surmama kasvajakarakke *in vitro* ja põhjustama kasvajate nekroosi organismis (Cheng et al., 2014). TNF- $\alpha$  tootmist stimuleerivad erinevad ohusignaalid, nagu LPS, viirused ning ka teiste tsütokiinide kombinatsioonid (Shin et al., 1993). TNF- $\alpha$  on üks tähtsamaid regulaatoreid põletikuvastuses, mida toodavad peamiselt

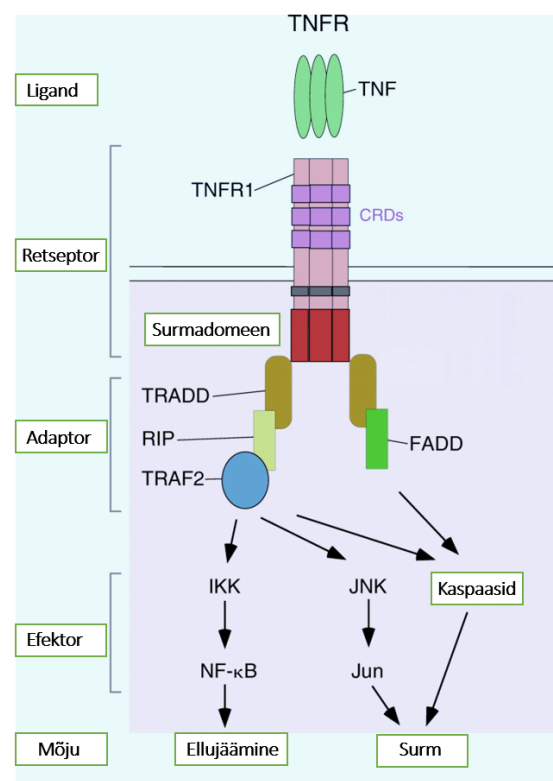
aktiveeritud makrofaagid ja T-lümfotsüüdid (Bradley, 2008). Lisaks kuuluvad TNF- $\alpha$  funktsioonide hulka selektiinide ning raku adhesioonimolekulide (*cell adhesion molecules*, CAM) ekspresseerimine, et leukotsüüdid suudaksid kinnituda põletikulisele endoteelile (Zelová ja Hošek, 2013). TNF- $\alpha$  osaleb ka kemokiinide tootmises ja apoptoosi esilekutsumises (Sherwood ja Toliver-Kinsky, 2004; Zelová ja Hošek, 2013). Madalas kontsentratsioonis kutsub TNF- $\alpha$  esile lokaalset põletikku, mis omakorda aktiveerib leukotsüüte ning mõjutab endoteelirakke (joonis 5). Mõõdukas kontsentratsioonis põhjustab TNF- $\alpha$  süsteemset põletikku – palaviku esilekutsumine ning akuutse faasi valkude ja leukotsüütide tootmine. Pikaajaline kõrge kontsentratsioon võib põhjustada septilist šokki, mis viib vererõhu languseni, trombid moodustumiseni ning hüpoglükeemiani (Uibo et al., 2015) (joonis 5). Kuna TNF- $\alpha$  osaleb mitmete krooniliste põletikuliste haiguste kujunemises – RA, psoriaas, Crohn'i tõbi, liigesejäikuslik lülipõletik (Cheng et al., 2014), on ta oluline sihtmärk haiguste ravis. TNF- $\alpha$  vastased ravimid seonduvad tsütokiini või selle retseptoriga, inhibeerides signaali (Moots et al., 2018).



**Joonis 5. TNF- $\alpha$  bioloogiline toime sõltub kontsentratsioonist.** Madalas kontsentratsioonis initsieerib TNF- $\alpha$  lokaalset põletikku, mis aktiveerib leukotsüüte ja stimuleerib endoteelirakke tootma adhesioonimolekule ning kemokiine. Mõõdukas kontsentratsioonis põhjustab palavikku ja suurendab akuutse faasi valkude tootmist. Pikaajaline kõrge kontsentratsioon võib aga viia septilise šoki tekkeni (kohandatud Uibo et al., 2015).

## 1.2.6 TNF- $\alpha$ signaalirada

TNF- $\alpha$  seondub TNF retseptorile (*TNF receptor*, TNFR) (Locksley et al., 2001) ning aktiveerib kolme erinevat signaalirada – NF- $\kappa$ B, MAPK ja kaspasi signaalirada (Aggarwal, 2003; Mathew et al., 2009) (joonis 6). NF- $\kappa$ B rada aktiveerib geene, mis on seotud raku ellujäämisega, põletiku esilekutsumisega ja raku proliferatsiooniga ja diferentsiatsiooniga (Hayden ja Ghosh, 2014). Teiseks on MAPK rajad, mille kaudu reguleeritakse erinevaid rakulisi funktsioone, nagu apoptoos ja proliferatsioon (Hayden ja Ghosh, 2014). TNF- $\alpha$  märklaudgeenidena on antud töös kasutatud *MCP-1*, *IL-6* ja *MAP3K8* geene. MCP-1 rolliks on monotsüütide ja makrofaagide migratsiooni ja infiltratsiooni regulatsioon (Deshmane et al., 2009). *IL-6* kodeerib IL-6 tsütokiini (Scheller et al., 2006). MAP3K8 osaleb MAPK ja JNK radade aktiveerimises ning mängib olulist rolli põletikuliste mediaatorite tootmises (Sanz-Garcia et al., 2017).

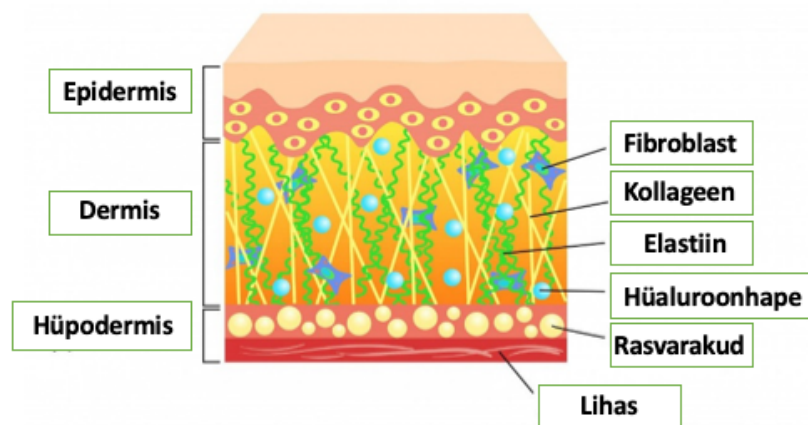


**Joonis 6. TNF- $\alpha$  signaalirada.** Kui TNF- $\alpha$  seostub retseptorile, kaasab viimane signaalirajasse valgukompleksi, mis koosneb valkudest TRADD, TRAF2 ja RIP. TRADD võib interakteeruda ka FADD-iga, mis viib kaspaside aktivatsioonini ja apoptoosini. TRAF2, RIP ja IKK aktiveerivad NF- $\kappa$ B, mis vahendab raku eluspüsimiseks vajalikke geene. TRAF2 on oluline vahend JNK kaskaadi aktiveerimiseks, mis omakorda vahendab rakusurma (kohandatud Mathew et al., 2009).



### 1.3 Naha fibroblastid

Fibroblaste leidub mitmes erinevas organis, kus nad täidavad spetsiifilisi funktsioone (Lynch ja Watt, 2018). Olenevalt organismist varieerub fibroblastidel ekstratsellulaarse matriksi tootmine, erinevad immunomodulaatorsed funktsioonid, haavade parandamise võimekus jpm (Brouty-Boyé et al., 2000; Parsonage et al., 2005). Käesolevas töös keskenduti inimese naha dermaalsetele fibroblastidele. Dermaalsed fibroblastid paiknevad naha dermise kihis (joonis 7) ning on seal põhiline rakutüüp. Dermaalsete fibroblastide peamiseks ülesanneteks on toota ekstratsellulaarset matriksit ning aidata kaasa karvafolliikuli moodustumisele. Naha sees võivad erinevates kohtades konkreetsed ülesanded varieeruda (Driskell ja Watt, 2015; Sennett ja Rendl, 2012). Naha fibroblastid on naha komponendina väga olulised. Lisaks ekstratsellulaarse matriksi tootmisele suhtlevad nad nii omavahel kui ka teiste rakutüüpidega, mistõttu on need rakud naha füsioloogia reguleerimisel väga olulised. (Ansel et al., 1996; Detmar, 1996; Werner ja Smola, 2001). Lisaks eelmainitule osalevad fibroblastid ka põletikuvastuses ja haavade paranemises. Tänu tsütokiinide ja kemokiinide tootmisele on fibroblastid võimelised reguleerima immuunrakkude tegevust kudede kahjustuste ja põletiku puhul (Silzle et al., 2004). Fibroblastid vabastavad tsütokiine ja kasvufaktoreid, mis moduleerivad keratinotsüütide aktiivsust ja seeläbi mängivad vigastuste parandamises olulist rolli (Jordana et al., 1994; Kessler-Becker et al., 2004).



**Joonis 7. Naha struktuur ning fibroblastid.** Nahk koosneb kolmest kihist. Fibroblastid asuvad kolmest nahakihist keskmises ehk dermises.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Kohandatud <https://epidermolysisbullosanews.com/2018/03/26/fibroblasts-skin-injections-better-wound-healing-closure-study/>

## 2 EKSPERIMENTAALOSA

### 2.1 Töö eesmärgid

**Hüpotees:** Fibroblastide korduval stimulatsioonil põletikus osalevate tsütokiinidega muutuvad geeniekspressiooni tasemed võrreldes esmase stimulatsiooniga.

#### **Ekspérimentaalse töö eesmärgid:**

1. Leida markergeenide ekspressioonitasemete mõõtmise kaudu optimaalne ajavahemik fibroblastide IFN- $\alpha$ , IL-6 ning TNF- $\alpha$  tsütokiinidega stimuleerimiseks.
2. Uurida fibroblastide võimet vastata IFN- $\alpha$ , IL-6 ning TNF- $\alpha$  tsütokiinidele, pärast eelnevat stimulatsiooni (koos puhkeperioodiga või ilma) samade tsütokiinidega.

### 2.2 Materjal ja metoodika

#### 2.2.1 Kasutatud rakuliin

Antud töös kasutati normaalseid inimese dermaalseid fibroblaste (*normal human dermal fibroblasts*, NHDF) (Lonza). Rakke kasvatati DMEM (*Dulbecco's modified eagle medium*) (Lonza, BioWhittaker) söötmel. Söötmesse lisati 10 % 56 °C juures inaktiveeritud vasikaloote seerumit, 100 U/ml penitsilliini, 100 µg/ml streptomütsiini ja 2 mM glutamiini. Iga katse puhul kasvatati rakke 37 °C juures, 5 % CO<sub>2</sub> kontsentratsioonil koekultuuri inkubaatoris.

#### 2.2.2 Rakkude sulatamine, kasvatamine ja külmutamine

NHDF rakke sulatati DMEM söötmega ning lisati 50 ml katsutisse. Rakud tsentrifuugiti põhja toatemperatuuril 10 minutit 200 x g. Seejärel imeti sööde pealt ära ning rakke resuspendeeriti söötmes. Rakkudele lisati 10 ml söödet ning pandi kasvama 10 cm<sup>2</sup> tassile CO<sub>2</sub> inkubaatorisse. Kui rakud olid plaadil kasvanud ~ 80 % tiheduseni, imeti sööde pealt ära ja rakke pesti 5 ml DPBS-iga (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*) (Corning). Rakkudele lisati 500 µl 0,05% trüpsiini (Corning) ning inkubeeriti 3 minutit CO<sub>2</sub> inkubaatoris. Seejärel lisati rakkudele 10 ml söödet ja rakud tõsteti ümber 50 ml katsutisse ning tsentrifuugiti põhja toatemperatuuril 10 minutit 200 x g. Rakkudelt imeti sööde pealt ära ning suspendeeriti 1 ml DMEM söötmes. Rakud loeti üle rakulugejaga (Luna, Dual Fluorescence Cell Counter) ja pandi eksperimendi sooritamiseks kasvama 24-augulisele plaadile. Ülejäänud rakud külmutati. Selle jaoks tsentrifuugiti rakud põhja toatemperatuuril 10 minutit 200 x g ning sööde imeti pealt ära. Rakke

resuspendeeriti 500 µl puhvris C ning seejärel lisati segule samas mahus puhvrit AB (CLT-Cryo ABC Media Kit) (Cellular Technology Limited). Rakud säilitati krüoviaalides -80 °C juures.

### **2.2.3 Kasutatud tsütokiinid**

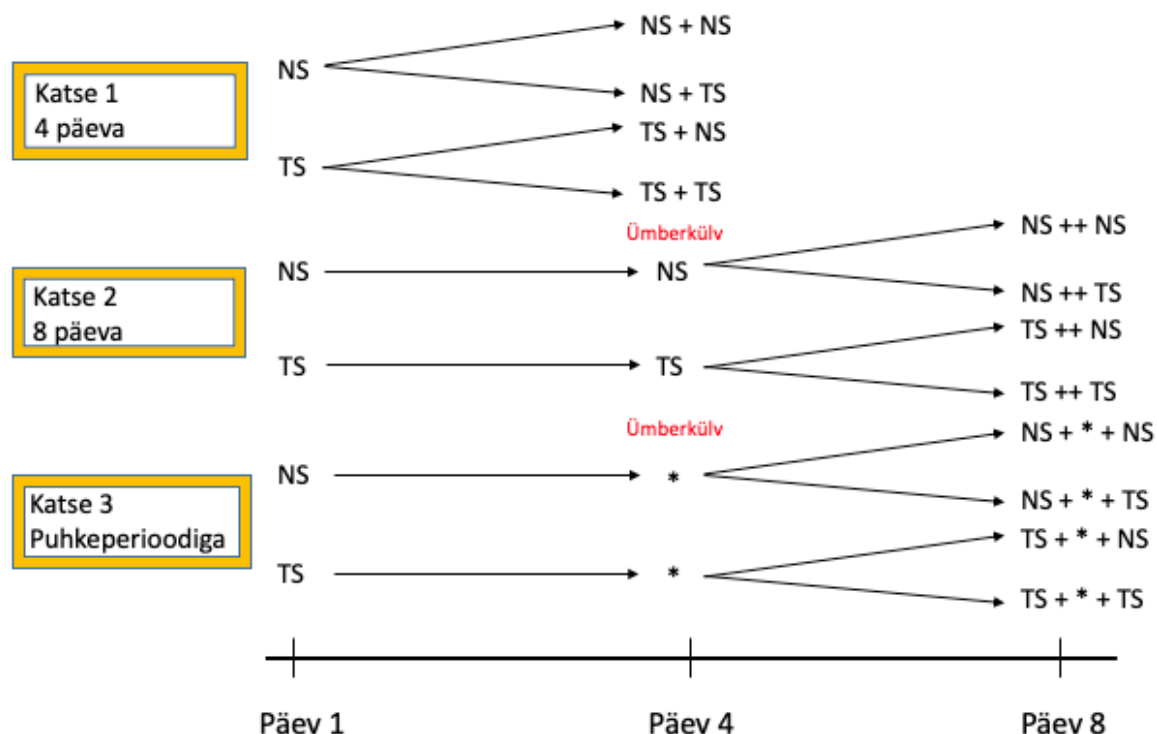
Käesolevas töös kasutati fibroblastide stimuleerimiseks erinevaid tsütokiine:

- IFN- $\alpha$  (MACS, Miltenyi Biotec)
- IL-6 (PeproTech)
- IL-6R (PeproTech)
- TNF- $\alpha$  (PeproTech)

Fibroblastide stimuleerimine viidi läbi 24-augulisel plaadil. Kõigepealt viidi läbi tsütokiinide optimeerimine, et leida sobiv kontsentratsioon ning stimulatsiooniaeg (tulemuste osa 2.3.1). Kuna IL-6 tsütokiin vajab toimimiseks ka tema retseptorit sIL-6R, lisati IL-6 tsütokiini stimulatsioonil rakkudele juurde samas kontsentratsioonis sIL-6R. Edaspidi tähistab IL-6 töö eksperimentaalses osas tsütokiini IL-6 ja tema retseptori sIL-6R segu.

### **2.2.4 Katseskeem**

Uurimistöö jaoks töötati välja katseskeem, mis koosnes kolmest erinevast katsest (joonis 9). Katsetes esinesid proovid paralleelselt kahes korduses ning omakorda kõiki katseid korrati kaks korda, erisused on välja toodud vastavate katsete juures tulemuste osas.



**Joonis 8.** Katseskeem. Praktiline osa koosneb kolmest erinevast katsest. Katse 1 kestab 4 päeva, katse 2 ja katse 3 kestuseks on 8 päeva. NS – mittestimuleeritud rakud; TS – tsütokiiniga stimuleeritud rakud; ++ – katse keskel sama konditsiooni jätkamine, nagu oli katse alguses; \* – puhkeperiood ehk sel ajal rakud tsütokiini stimulatsiooni ei saanud.

Kui rakud olid kasvanud ~ 80 % tiheduseni, võeti rakud üles 10 ml DMEM söötmes ning tsentrifuugiti põhja toatemperatuuril 10 minutit 200 x g juures. Seejärel võeti rakud üles 1 ml puhtas DMEM söötmes ning loeti üle rakulugejaga (Luna, Dual Fluorescence Cell Counter). Rakud jaotati laiali 24-augilisele plaadile 40 000 raku kaupa.

#### 2.2.4.1 Katse 1 (4 päeva)

24-augilisel plaadil lisati ühe augu kohta 250 µl söödet rakkudega ning 250 µl söödet vastava tsütokiiniga (TS + NS, TS + TS), kus TS tähistab tsütokiiniga stimuleeritud ja NS mittestimuleeritud proovi. Kontrollina kasutati proovi, mis sisaldas lisaks rakkudele 500 µl ilma tsütokiinita söödet (NS + NS). Seejärel jäeti rakud neljaks päevaks kasvama. Nelja päeva möödudes tehti pooltele proovidele uus stimulatsioon vastava tsütokiiniga (NS + TS, TS + TS). Uue stimulatsiooni pikkus ja aeg olid tsütokiinide puhul varieeruv, vastavalt konkreetse tsütokiini optimeerimisest saadud tulemustele. Ülejäänud proove inkubeeriti 4 päeva möödudes ilma tsütokiinita söötmes (TS + NS, NS + NS).

#### *2.2.4.2 Katse 2 (8 päeva)*

Skeemis tähistab ++ katse keskel sama konditsiooni jätkamist, nagu oli katse alguses. 24-augulisel plaadil lisati ühe augu kohta 250 µl söödet rakkudega ning 250 µl söödet vastava tsütokiiniga (TS ++ NS, TS ++ TS). Kontrollina kasutati proovi, mis sisaldas lisaks rakkudele 500 µl söödet (NS ++ NS). Seejärel jäeti rakud 8 päevaks kasvama. Katse keskel, 4. päeval toimus ümberkülv, sest fibroblastide kasvukiirus on kõrge ning plaadid kasvasid täis. Plaatidelt imeti pealt ära vana sööde ning rakkudele tehti 500 µl DPBS pesu. Seejärel lisati rakkudele 100 µl trüpsiini ja inkubeeriti 3 minutit CO<sub>2</sub> kapis. Trüpsiiniga rakkudele lisati 1 ml söödet, et neutraliseerida trüpsiini toime, ja rakud tõsteti ümber katsutisse. Rakke tsentrifuugiti toatemperatuuril 10 minutit 200 x g juures. Seejärel imeti rakkude pealt ära sööde ja suspendeeriti 1 ml puhtas söötmes. Rakud loeti üle ja pandi puhtale plaadile kasvama. Vastavalt katse alguse tingimustele lisati rakkudele samamoodi värske tsütokiini stimulatsioon (TS ++ NS, TS ++ TS) või hoiti rakke puhtas söötmes (NS ++ NS, NS ++ TS). Katse algusest kaheksa päeva möödudes tehti pooltele proovidele uus stimulatsioon vastava tsütokiiniga (NS ++ TS, TS ++ TS). Ülejäänud proove inkubeeriti ilma tsütokiinita söötmes (TS ++ NS, NS ++ NS).

#### *2.2.4.3 Katse 3 (8 päeva puhkeperioodiga)*

Skeemis tähistab \* puhkeperioodi. 24-augulisel plaadil lisati ühe augu kohta lisati 250 µl söödet rakkudega ning 250 µl söödet vastava tsütokiiniga (TS ++ NS, TS ++ TS). Kontrollina kasutati proovi, mis sisaldas lisaks rakkudele 500 µl söödet (NS ++ NS). Puhkeperioodiga katse puhul stimuleeriti alguses rakke 24 h ja seejärel jäeti nädalaks puhtasse söötmesse. Puhkeperioodiga katse keskel, 4. päeval toimus ümberkülv. Plaatidelt imeti pealt ära vana sööde ning rakkudele tehti 500 µl DPBS pesu. Seejärel lisati rakkudele 100 µl trüpsiini ja inkubeeriti 3 minutit CO<sub>2</sub> kapis. Trüpsiiniga rakkudele lisati 1 ml söödet ja tõsteti ümber katsutisse. Rakke tsentrifuugiti toatemperatuuril 10 minutit 200 x g juures. Seejärel imeti rakkude pealt ära sööde ja suspendeeriti 1 ml puhtas söötmes. Rakud loeti üle ja pandi puhtale plaadile kasvama. Kõikidele proovidele lisati puhas sööde, et lasta rakkudel puhata. Katse algusest kaheksa päeva möödudes tehti pooltele proovidele uus stimulatsioon vastava tsütokiiniga (NS ++ TS, TS ++ TS). Ülejäänud proove inkubeeriti ilma tsütokiinita söötmes (TS ++ NS, NS ++ NS).

Kõikide katsete lõpus imeti ära sööde ning tehti 500 µl DPBS pesu. Proovidele lisati 1000 µl TRIzol reagenti (Thermo Fischer Scientific), inkubeeriti toatemperatuuril 5 minutit ning resuspendeeriti. Rakud tõsteti katsutitesse ning säilitati -80 °C juures.

### 2.2.5 RNA eraldamine rakkudest

RNA eraldati kõikidest proovidest. Selleks kasutati RNeasy Micro Kit (Qiagen) komplekti vastavalt tootja protokollile. RNA eraldamise järgselt mõõdeti RNA kogust NanoDrop ND-1000 spektrofotomeetriga (NanoDrop Technologies). Mõõtmiseks nulliti spektrofotomeetri taust 1 µl RNAasi vaba vee (RNeasy Micro Kit) vastu ning RNA kontsentratsiooni mõõtmiseks võeti 1 µl proovi. RNA proovid säilitati -80 °C juures.

### 2.2.6 cDNA süntees

cDNA sünteesimiseks võeti ühe reaktsiooni kohta 11 µl RNA-d (30-60 ng/µl). Kokku segati RNA, 1 µl 10 mM dNTP segu (Fermentas) ning 1 µl 500 µg/ml oligo(dT)20 praimerit (Invitrogen). Seejärel inkubeeriti praimerite seostumise jaoks proove 5 minutit 65 °C juures, millele järgvalt hoiti proove 1 minuti jooksul jääl, et sekundaarstruktuurid uuesti ei tekiks. Samal ajal segati kokku cDNA sünteesi segu, millesse lisati ühe proovi kohta 4 µl 5x First Strand puhvrit (Invitrogen), 1 µl 0,1 M DTT (Invitrogen), 1 µl ribonukleasi inhibiitorit *RiboLock* (40 U/µl) (Fermentas) ja 1 µl *SuperScript* III pöördtranskriptaasi (200 U/µl) (Invitrogen). 7 µl kaupa resuspendeeriti segu proovidele juurde ning seejärel inkubeeriti 60 minutit 50 °C juures ja peale seda veel 15 minutit 70 °C juures, et reaktsioon peatada. cDNA proovid säilitati -20 °C juures.

### 2.2.7 Praimerite disainimine

Ekspressioonianalüüsi praimerid disainiti NCBI andmebaasis vastavalt (Primer-BLAST) uuritavate geenide kodeerivatesse aladesse nii, et praimerite järjestuste vaheline ala jääks kahe eksoni piiri peale. Disainitud ekspressioonipraimerite järjestused on toodud tabelis 1. Praimerid telliti firmast Metabion International AG.

**Tabel 1.** Ekspressioonipraimerite järjestused

Tsütokiin	Geen	Forward praimer	Reverse praimer
IFN-α	<i>CXCL10</i>	TTCCTGCAAGCCAATTTTGT	TTCTTGATGGCCTTCGATTC
IFN-α	<i>CHI3A</i>	CCTTGGAACCCCTCAATCTG	CAGTTATGTACAAGCTTAGCC
IFN-α	<i>IFIT1</i>	ATCCACAAGACAGAATAGCCAGATCT	TGTACTCATGGTTGCTGTAAATTAGGC
IFN-α	<i>RSAD2</i>	TTCCACACAGCCAAAACATCC	TGAAGAAATGGCTCTCCACC
IFN-α	<i>IFI44L</i>	GTGGCCTTGCTTACTAAAGTGGATG	CCCGGCTTTGAGAAGTCATAGA

IL-6	<i>SOCS3</i>	AGCAACATTGGAGGGGATGGA	CCTGAGGTGAAAGATGTCCCGT
TNF- $\alpha$ , IL-6	<i>MCP1</i>	CCAGTCACCTGCTGTTATAAC	TGGAATCCTGAACCCACTTCT
TNF- $\alpha$	<i>IL6</i>	ACCAGGCAAGTCTCCTCATTGAA	AGGCACTGGCAGAAAAACAACC
TNF- $\alpha$	<i>MAP3K8</i>	GCCGCAGACTCTCCAGAAA	TGCTGGCTCTTCACTTGCAT
Koduhoidja	<i><math>\beta</math>-ACT</i>	CTGGAACGGTGAAGGTGACA	CGGCCACATTGTGAACCTTG

## 2.2.8 RT-PCR

Kõrgenenud ekspressiooniga geenide detekteerimiseks kasutati pöördtranskriptsiooni polümeraasi ahelreaktsiooni (*reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR). Proove analüüsi Viia 7 RT-qPCR masinaga (Applied Biosystems). Reaktsioonisegusse lisati ühe proovi kohta 14,6  $\mu$ l MQ, 16,3  $\mu$ l *2x Maxima<sup>TM</sup> SYBR Green/ROX qPCR Master Mix* (Fermentas) ning 1,5  $\mu$ l 5 mM *forward* ja *reverse* praimerite segu. DNA-d lahjendati 5x ning sellest võeti 1  $\mu$ l, mis lisati 30  $\mu$ l reaktsioonisegule. Segu jagati 10  $\mu$ l kaupa kolmes korduses 384-augulisele mikrotiiterplaadile. Esimeses katsekorduses sooritati pipeteerimine spetsiaalse pipeteerimisrobotiga (QIAgility). Teises katsekorduses pipeteeriti proovid plaatidele manuaalselt. Kõikide praimerite puhul kasutati kontrollina MQ-d. qPCR-i programmietapid olid 1 tsüklil 10 minutit 95 °C juures polümeraasi aktivatsiooni, denaturatsiooni 45 tsüklit 15 sekundit 95 °C juures, praimerite seondumine ning produkti paljundamine 1 minut 60 °C juures, 1 tsüklil 95°C juures 15 sekundit dissotsiatsioonietappi, 60 °C 1 minuti juures, millele järgnes 1 tsüklil sulamiskõvera analüüsi. Andmete analüüsiks kasutati võrdlevat Ct meetodit ning selle jaoks kasutati valemit  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak ja Schmittgen, 2001). Normaliseerimiseks kasutati koduhoidjageeni  $\beta$ -ACT, millele järgnes normaliseerimine stimuleerimata rakupopulatsiooni suhtes.

## 2.2.9 Statistiline analüüs

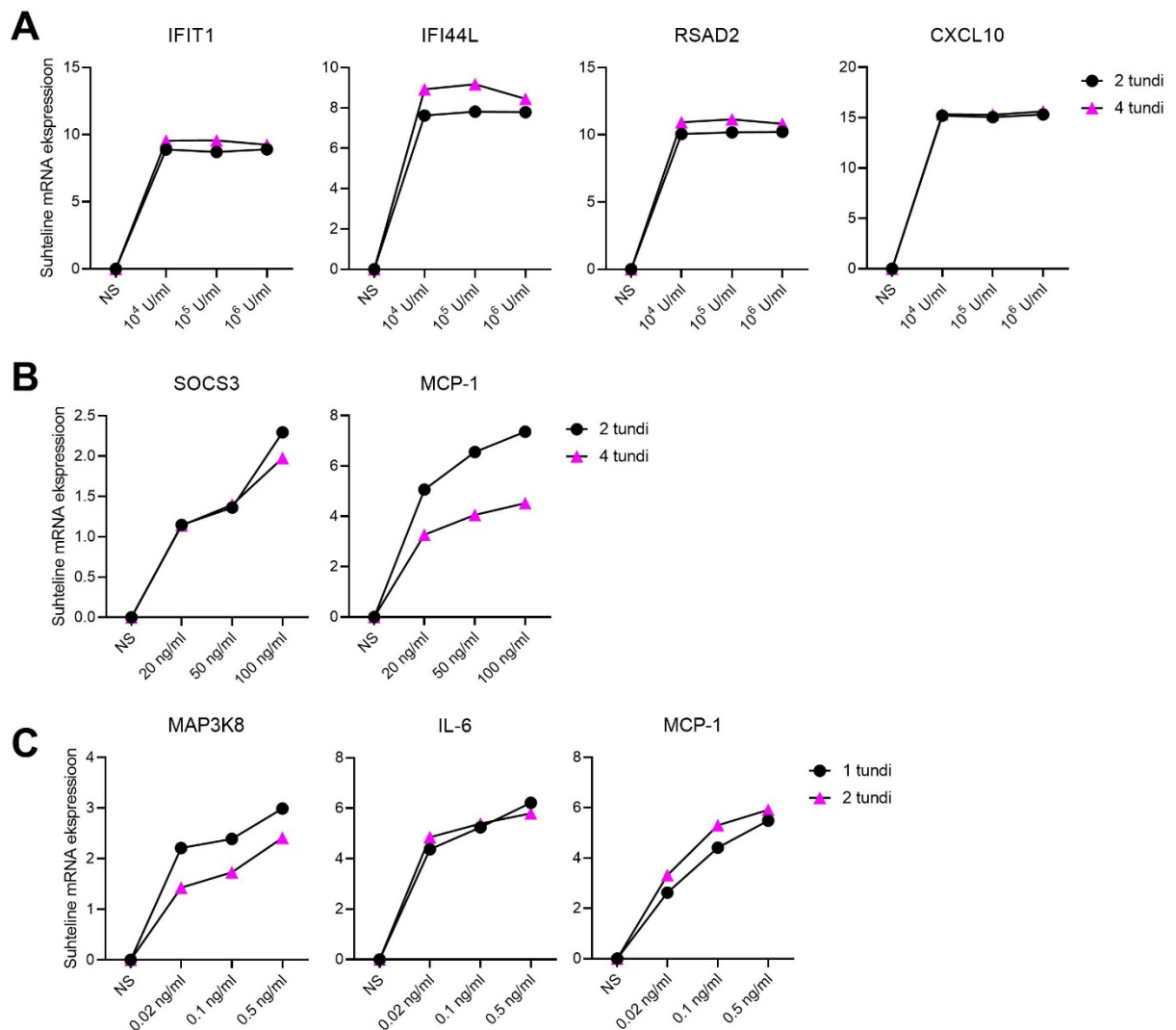
Ekspressioonianalüüsi katseid sooritati kahes korduses, igas katses olid proovid kahes paralleelis. Puhkeperioodiga katse sooritati vaid ühes korduses kahes paralleelis ning seetõttu ei ole nende katsete puhul teostatud statistilist analüüsi. Ekspressioonitasemed konverteeriti logaritmitud väärtustesse. Tulemused on esitatud proovide keskmiste väärtustena ning graafikutele on lisatud standardhälve (*standard deviation*, SD). Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, kus võrreldi kõiki gruppe koos. Spetsiifilisemaks analüüsiks viidi läbi Tukey test, kus võrreldi gruppe paarikaupa. Statistiliselt oluliseks loeti tulemusi, mille  $p$  väärtus  $< 0.05$ . Analüüsiks ning graafikute joonistamiseks kasutati programmi GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, Inc).

## 2.3 Tulemused

### 2.3.1 Tsütokiinide stimulatsioonide optimeerimine

Optimeerimise katsega leiti igale tsütokiinile (IFN- $\alpha$ , IL-6 ning TNF- $\alpha$ ) märklaudgeeni ekspressioonitaseme määramiseks optimaalne kontsentratsioon ja stimulatsiooniaeg. Tsütokiinide kontsentratsioonide optimeerimiseks kasutati tootja poolt antud infolehel olevat kontsentratsiooni vahemikku. Rakke inkubeeriti koekultuuri inkubaatoris teatud ajapunktidega, mis on leitud vastavalt kirjandusest (Hao ja Baltimore, 2009; Moll et al., 2011; Spö Rri et al., 1999). NHDF rakke stimuleeriti tsütokiiniga 24-augulisel plaadil. Rakkudest eraldati RNA, sünteesiti cDNA ning kontrolliti märklaudgeenide ekspressioonitasemeid qPCR-ga. Valiti välja ajapunktid ning kontsentratsioonid, mille puhul suhtelise geeniekspressiooni tase oli kõrgeim. Tsütokiin IFN- $\alpha$  puhul katsetati stimulatsiooni ajapunkte 2 ja 4 tundi ning kontsentratsioone  $10^4$ ,  $10^5$  ja  $10^6$  U/ml. Ekspressioonitasemeid mõõdeti IFN- $\alpha$  märklaudgeenidel – *IFIT1*, *IFI44L*, *RSAD2* ning *CXCL10*. Kahe ajapunkti võrdlusel ilmnes 4 tunnise stimulatsiooni puhul kõrgem ekspressioonitase märklaudgeenidel, v.a *CXCL10* (joonis 9A). Kontsentratsioonidest olid kõrgema geeniekspressiooni tasemega nii  $10^4$  kui ka  $10^5$  U/ml. Kuna kahe kontsentratsiooni erinevus oli väike, siis tsütokiini kokkuhoidmise eesmärgil otsustati madalama kontsentratsiooni  $10^4$  U/ml kasuks (joonis 9A). Tsütokiin IL-6 puhul määrati geenide ekspressioonitase ajapunktides 2 ja 4 tundi ning kontsentratsioonidega 20, 50 ja 100 ng/ml. Märklaudgeenideks olid IL-6 katses *SOCS3* ning *MCP-1*. Kõrgeim ekspressioonitase oli 100 ng/ml kontsentratsioonil 2 tunni jooksul (joonis 9B). TNF- $\alpha$  katses mõõdeti ekspressioonitasemeid ajapunktidega 1 ja 2 tundi ning kontsentratsioonidega 0,02, 0,1 ja 0,5 ng/ml. TNF- $\alpha$  märklaudgeenidena kasutati katses *MAP3K8*, *IL-6* ning *MCP-1*. Ekspressioonitase oli kõrgeim kontsentratsioonil 0,5 ng/ml 1 tunni jooksul, v.a *MCP-1* 2 tundi (joonis 9C).





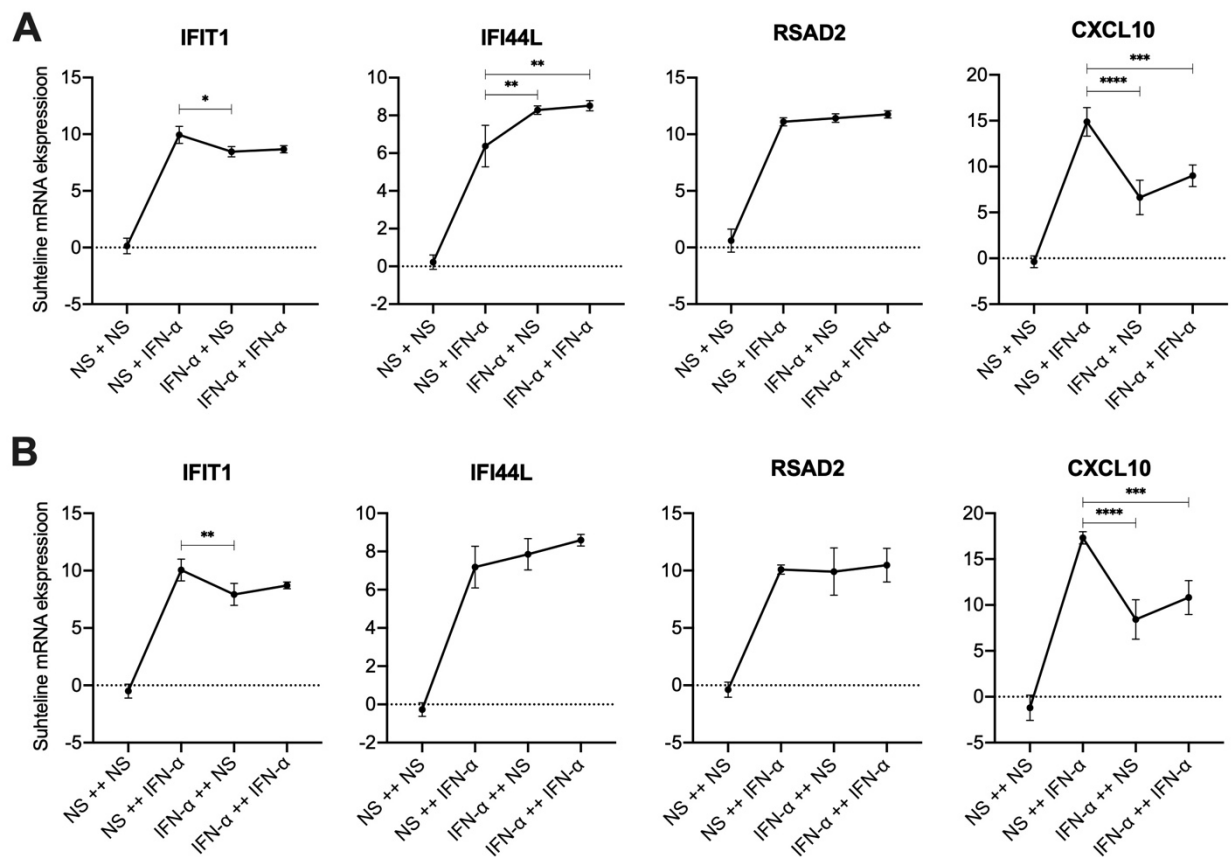
**Joonis 9. Tsütokiinidega optimeerimine.** NHDF rakke stimuleeriti tsütokiinidega IFN- $\alpha$ , IL-6 ja TNF- $\alpha$ . Võrdluseks on stimuleerimata proov (NS, *not stimulated*). (A) IFN- $\alpha$ -ga stimuleeriti rakke 2 ning 4 tundi kontsentratsioonidega  $10^4$ ,  $10^5$  ja  $10^6$  U/ml (x-telg). Stimulatsiooni järgselt mõõdeti IFN- $\alpha$  märklaudgeenide *IFIT1*, *IFI44L*, *RSAD2* ning *CXCL10* suhtelist mRNA ekspressiooni (y-telg). (B) IL-6 puhul stimuleeriti rakke 2 ja 4 tundi ning kontsentratsioonidega 20, 50 ja 100 ng/ml (x-telg). Märklaudgeenideks olid IL-6 katses *SOCS3* ning *MCP-1* (y-telg). (C) TNF- $\alpha$ -ga stimuleeriti rakke 1 ja 2 tundi kontsentratsioonidega 0,02, 0,1 ja 0,5 ng/ml (x-telg). TNF- $\alpha$  märklaudgeenidena mõõdeti *MAP3K8*, *IL-6* ning *MCP-1* suhtelist mRNA ekspressiooni (y-telg). Ekspressioonitasemed on konverteeritud logaritmitud väärtustesse.

Kokkuvõtvalt optimeerimise katse tulemusena leiti ajapunktid ning kontsentratsioonid, mille puhul suhtelise geeniekspressiooni tase oli kõrgeim. IFN- $\alpha$  optimeeeritud kontsentratsioon ja

aeg on  $10^4$  U/ml, 4 tundi. IL-6 optimiseeritud kontsentratsioon ja aeg on 100 ng/ml, 2 tundi. TNF- $\alpha$  optimiseeritud kontsentratsioon ja aeg on 0,5 ng/ml, 1 tund.

### 2.3.2 4- ja 8-päevane IFN- $\alpha$ stimulatsioon

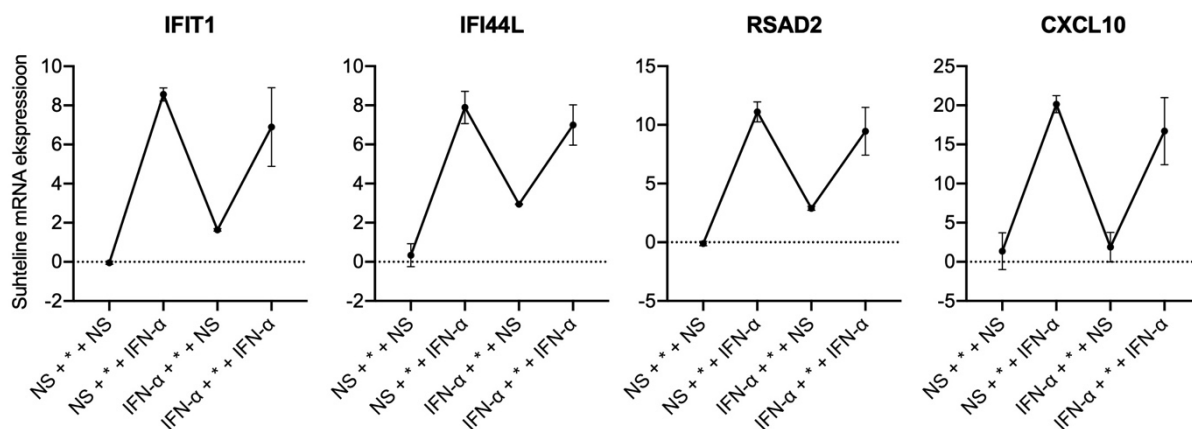
Rakke stimuleeriti IFN- $\alpha$ -ga ning seejärel uuriti märklaudgeenide ekspressioonitasemeid: *IFIT1*, *IFI44L*, *RSAD2* ja *CXCL10*. 4-päevase katse puhul stimuleeriti rakke neljas erinevas konditsioonis: NS + NS, NS + IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  + NS ning IFN- $\alpha$  + IFN- $\alpha$  (joonis 10A). 8-päevases katses, kus katse keskel oli ümberkülv, on samuti neli erinevat konditsiooni: NS ++ NS, NS ++ IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$  ++ NS ning IFN- $\alpha$  ++ IFN- $\alpha$  (joonis 10B). Ekspressioonianalüüsi katseid sooritati kahes korduses, igas katses olid proovid kahes paralleelis (erisused on jooniste all välja toodud). Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, kus võrreldi kõiki gruppe koos. ANOVA testi tulemuste põhjal on nii 4-päevases kui ka 8-päevases katses kõikide geenide puhul statistiliselt oluline erinevus gruppide vahel (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ) (Lisa 1 ja Lisa 2). Et põhjalikumalt uurida, milliste paarikaupa gruppide vahel olulised erinevused ilmnesid, viidi läbi Tukey test, kus võrreldi gruppe paarikaupa. Tukey testi tulemused on välja toodud graafikutel (joonis 10) ning lisades (Lisa 1 ja Lisa 2). Kuna 4- (joonis 10A) ja 8-päevase (joonis 10B) katse geenid käituvad mõlemad katses sarnaselt, siis edaspidi analüüsitakse neid koos tähistusega +[+]. Geeniekspressioonitulemuste põhjal võib tinglikult jaotada geenid kahte gruppi – *IFI44L* ning *RSAD2* ja *IFIT1* ning *CXCL10*. *IFI44L* ja *RSAD2* geenide tasemed on sarnased lühiajalisel 4-tunnisel stimulatsioonil (NS +[+] IFN- $\alpha$ ) ning pikaajalisel päevi kestval stimulatsioonil (IFN- $\alpha$  +[+] NS ja IFN- $\alpha$  +[+] IFN- $\alpha$ ) – ehk IFN- $\alpha$  mõju jääb püsima pikalt ning geeniekspressioonitase ei lange vahepeal. *IFI44L* geeni puhul koguni tõuseb 4-päevases katses (joonis 10A). *IFIT1* ning *CXCL10* geenide puhul on lühiajaline 4-tunnine stimulatsioon (NS + IFN- $\alpha$ ) mõjunud kõige tugevamalt, tõstes ekspressioonitaset. Antud tõus on statistiliselt oluline, võrreldes algselt stimuleeritud mitu päeva ja hiljem mittestimuleeritud prooviga (IFN- $\alpha$  +[+] NS) mõlema geeni puhul. Samas pikaajaline stimulatsioon (IFN- $\alpha$  +[+] NS ja IFN- $\alpha$  +[+] IFN- $\alpha$ ) on madalam võrreldes lühiajalisega, eelkõige on langus märgatav *CXCL10* geeni puhul. Üheski geen ei esine statistiliselt olulist muutust pikaajalisel stimulatsioonil IFN- $\alpha$  +[+] NS ja IFN- $\alpha$  +[+] IFN- $\alpha$  vahel, ehk kui algul rakke stimuleerida, siis rakkude uuesti stimuleerimine pärast 4. või 8. päeva ei muuda ekspressioonitaset (joonis 10A ja 10B).



**Joonis 10. IFN-α 4- ja 8-päevane katse.** NHDF rakke stimuleeriti tsütokiiniga IFN-α, võrdluseks on graafikul stimuleerimata proov (NS, *not stimulated*). (A) 4-päevases katses on kokku neli erinevat konditsiooni – NS + NS, NS + IFN-α, IFN-α + NS ning IFN-α + IFN-α (x-telg). (B) 8-päevases katses on neli erinevat konditsiooni - NS ++ NS, NS ++ IFN-α, IFN-α ++ NS ning IFN-α ++ IFN-α (++ tähistab rakkude ümberkülvamist pärast 4. päeva ning uuesti sama konditsiooni jätkamist, mis oli katse alguses) (x-telg). Pärast rakkude stimulatsiooni mõõdeti märklaudgeenide *IFIT1*, *IFI44L*, *RSAD2* ja *CXCL10* suhtelise mRNA ekspressioonitasemed (y-telg). Katseid sooritati kahes korduses, igas katses olid proovid kahes paralleelis (kokku 4 paralleeli). V.a 4-päevase katse puhul kõikide geenide IFN-α+IFN-α ning *RSAD2* geeni NS+IFN-α stimulatsiooni puhul kasutati tulemustes 3 paralleeli; 8-päevase katse puhul *RSAD2* geeni NS++NS stimulatsiooni puhul kasutati tulemustes 3 paralleeli. Graafikutel on NHDF rakkude keskmine ekspressioon ± SD. Statistiliseks analüüsiks viidi läbi Tukey test, kus võrreldi gruppe paarikaupa (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Graafikule ei ole lisatud mittestimuleeritud kontrollproovi p-väärtus võrdluses teiste stimulatsiooni gruppidega, mille võib leida Lisa 1 ning Lisa 2 osadest.

### 2.3.3 8-päevane puhkeperioodiga IFN- $\alpha$ stimulatsioon

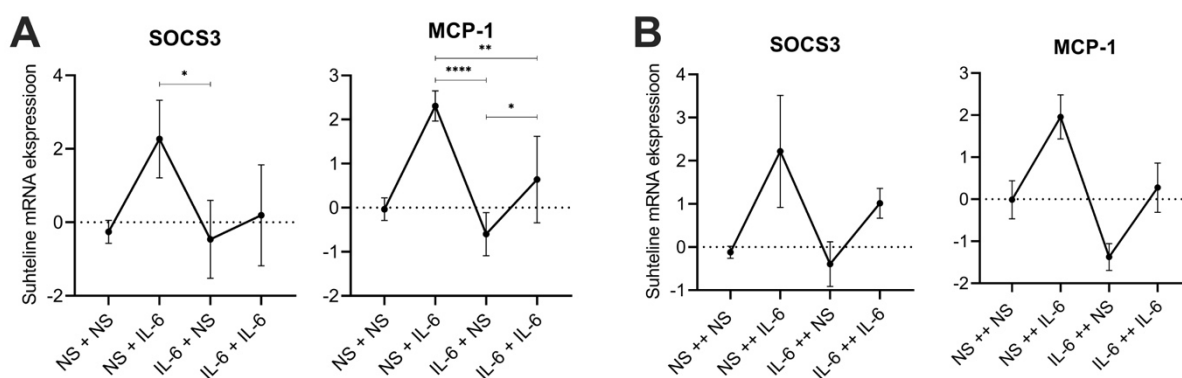
8-päevase puhkeperioodiga katse puhul uuriti samuti IFN- $\alpha$  märklaudgeene: *IFIT1*, *IFI44L*, *RSAD2* ja *CXCL10* (joonis 11). Puhkeperiood antud katses tähistab rakkude inkubeerimist puhtas söötmes katse keskel ehk võimalust rakkudel puhata tsütokiini stimulatsioonist. Kõik geenid on antud katses omavahel sarnase ekspressioonimustriga. Puhkeperioodi katse puhul ei olnud võimalik teha statistilist analüüsi, kuid antud stimulatsiooniskeemi puhul esineb teatud trend. Geeniekspressioonitase on kõrge nii algul mittestimuleeritud ja hilisemalt stimuleeritud proovi (NS  $++$  IFN- $\alpha$ ) kui ka mõlemal korral stimuleeritud proovi (IFN- $\alpha$   $++$  IFN- $\alpha$ ) puhul. Kuna need tasemed on sarnased, siis tundub, et puhkeperioodiga katse puhul lühiajaline 4-tunnine rakkude stimulatsioon ei muuda ekspressiooni taset võrreldes pikaajalise stimulatsiooniga ehk tolerantsust ei teki. Tolerantsus on selline seisund, kus esimese stimulatsiooni järel teine stimulatsioon annab tunduvalt nõrgema vastuse. Selge erinevus esineb IFN- $\alpha$   $++$  NS puhul võrreldes 4- ja 8-päevase katsega – kui pärast puhkeperioodi rakke ei stimuleerita IFN- $\alpha$ -ga uuesti, ei tõuse geeniekspressiooni tase (joonis 11). Ilmselt langeb geeniekspressioonitase IFN- $\alpha$  maha pesemise järgselt ning seetõttu polegi vahet kas esimene stimulatsioon on saadud või ei. Ööpäevane stimulatsioon (IFN- $\alpha$   $++$  NS) ei jäänud püsima nädalaja lõpuni, järelikult IFN- $\alpha$  märklaudgeenide ekspressiooni tõusuks on vajalik pidev IFN- $\alpha$  stimulatsioon.



**Joonis 11. IFN- $\alpha$  8-päevane puhkeperioodiga katse.** NHDF rakke stimuleeriti IFN- $\alpha$ -ga vastavalt skeemile 8 päeva jooksul. Lisaks oli katse keskel puhkeperiood ehk rakke inkubeeriti puhtas söötmes. Võrdluseks on graafikul stimuleerimata proov (NS, *not stimulated*). Katses on neli erinevat konditsiooni - NS  $++$  NS, NS  $++$  IFN- $\alpha$ , IFN- $\alpha$   $++$  NS ning IFN- $\alpha$   $++$  IFN- $\alpha$  (\* tähistab puhkeperioodi) (x-telg). Pärast rakkude stimulatsiooni mõõdeti märklaudgeenide *IFIT1*, *IFI44L*, *RSAD2* ja *CXCL10* suhtelise mRNA ekspressioonitasemed (y-telg). Graafikutel on NHDF rakkude keskmine ekspressioon. Kõikide geenide puhul stimulatsiooniga NS  $++$  NS ja IFN- $\alpha$   $++$  IFN- $\alpha$  esineb 3 paralleeli, NS  $++$  IFN- $\alpha$  ja IFN- $\alpha$   $++$  NS 2 paralleeli.

### 2.3.4 4- ja 8-päevane IL-6 stimulatsioon

Rakke stimuleeriti tsütokiiniga IL-6 ning seejärel uuriti märklaudgeenide ekspressioonitasemeid: *SOCS3* ja *MCP-1*. 4-päevase katse puhul stimuleeriti rakke neljas erinevas konditsioonis: NS + NS, NS + IL-6, IL-6 + NS ning IL-6 + IL-6 (joonis 12A). 8-päevases katses on samuti neli erinevat konditsiooni: NS ++ NS, NS ++ IL-6, IL-6 ++ NS ning IL-6 ++ IL-6 (joonis 12B). 4-päevase ekspressioonianalüüsi katseid sooritati kahes korduses, 8-päevase ühes korduses. Igas katses olid proovid kahes paralleelis. Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, mille tulemuste põhjal on 4-päevases katses kõikide geenide puhul statistiliselt oluline erinevus gruppide vahel (Lisa 3) ning seejärel teostati Tukey test (Lisa 3), mille tulemused on välja toodud ka graafikul (joonis 12A). Kuna 4- (joonis 12A) ja 8-päevase (joonis 12B) katse geenid käituvad katses sarnaselt, siis edaspidi analüüsitakse neid koos tähistusega +[+]. 4- ja 8-päevaste katsete puhul on näha, et mõlema geeni profiilid on sarnased (joonis 12A ja 12B). Geeniekspressioon on märgatavalt tõusnud algul mittestimuleeritud ja hilisemalt lühiajaliselt 2 tundi stimuleeritud proovi (NS +[+] IL-6) puhul, mis eristub statistiliselt teistest stimulatsiooni katsetest 4-päevase katse puhul, 8-päevase katse puhul statistilist analüüsi teha ei saanud, kuid trend on sarnane 4-päevase katsega. Pikaajaliselt stimuleeritud ning lisaks 2-tunnise stimulatsiooniga proov (IL-6 +[+] IL-6) on kõrgema tasemega kui algul päevi stimuleeritud ja hilisemalt mittestimuleeritud proov (IL-6 +[+] NS). Ilmselt ei püsi IL-6 kontsentratsioon päevi ja on seetõttu madalam ning tõuseb alles IL-6 lisades ehk IL-6 toime on lühiajaline. IL-6 +[+] IL-6 geeniekspressioon võrreldes NS +[+] IL-6 stimulatsiooniga on madalam, mis võib viidata sellele, et IL-6 esialgsel stimulatsioonil tekib tolerantsus ja teistkordsel lisamisel (IL-6 +[+] IL-6) ei ole efekt enam nii võimas.

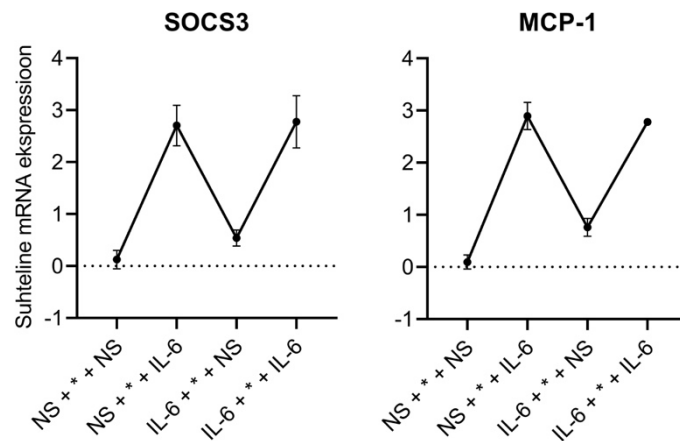


**Joonis 12. IL-6 4- ja 8-päevane katse.** NHDF rakke stimuleeriti IL-6-ga, graafikul on võrdluseks kasutatud stimuleerimata proovi (NS, *not stimulated*). (A) 4-päevases katses on kokku neli erinevat konditsiooni – NS + NS, NS + IL-6, IL-6 + NS ning IL-6 + IL-6 (x-telg) (B) ning 8-päevases

katses on neli erinevat konditsiooni - NS ++ NS, NS ++ IL-6, IL-6 ++ NS ning IL-6 ++ IL-6 (++) tähistab rakkude ümberkülvamist pärast 4. päeva ning ümberkülvamise järgselt sama konditsiooni jätkamist, mis oli katse alguses) (x-telg). Pärast fibroblastide stimulatsiooni mõõdeti märklaudgeenide *SOCS3* ja *MCP-1* suhtelise mRNA ekspressioonitasemed (y-telg). 4-päeva katse sooritati kahes korduses, igas katses olid proovid kahes paralleelis (kokku 4 paralleeli). 8-päevane katse sooritati ühes korduses, kahes paralleelis (kokku 2 paralleeli). Graafikutel on toodud NHDF rakkude keskmine ekspressioon  $\pm$  SD. Statistiliseks analüüsiks sooritati Tukey test, kus grupe võrreldi paarikaupa (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). Graafikule ei ole lisatud mittestimuleeritud kontrollproovi p-väärtus võrdluses teiste stimulatsiooni gruppidega, mille võib leida Lisa 3 osast.

### 2.3.5 8-päevane puhkeperioodiga IL-6 stimulatsioon

Puhkeperioodi katse puhul ei olnud võimalik teha statistilist analüüsi, kuid teatavad trendid esinevad antud stimulatsiooniskeemi puhul (joonis 13). Mõlemad geenid on omavahel väga sarnased. 4- ja 8-päevasest katsest eristub antud katse sellega, et kui esimestes oli kõige kõrgem geeniekspressiooni tase algul mittestimuleeritud ja hilisemalt stimuleeritud proovi (NS +[+] IL-6) puhul, siis selles katses on mõlema geeni puhul geeniekspressioonitase kõrge nii stimuleeritud proovi (IL-6 +++ IL-6) kui ka algul mittestimuleeritud ja hilisemalt stimuleeritud proovi (NS +++ IL-6) puhul. Kuna need tasemed on üpris sarnased, siis tundub, et puhkeperioodiga katse puhul algne rakkude stimulatsioon ei muuda ekspressiooni taset. Tolerantsust ei teki, sest teistkordsel tsütokiini lisamisel (IL-6 +++ IL-6) on geeniekspressioon sama kõrge kui NS +++ IL-6 puhul. Ilmselt langeb geeniekspressioonitase IL-6 maha pesemise järgselt. Pikaajaliselt stimuleeritud ning lisaks 2-tunnise stimulatsiooniga proov (IL-6 +++ IL-6) on kõrgema tasemega kui algul 24 tundi stimuleeritud ja hilisemalt mittestimuleeritud proov (IL-6 +++ NS), taaskord sarnane efekt ehk geeniekspressioonitase langeb IL-6 maha pesemise järgselt ning seetõttu polegi vahet kas esimene stimulatsioon on saadud või ei, mis võib viidata sellele, et IL-6 stimulatsioon on lühiajaline.

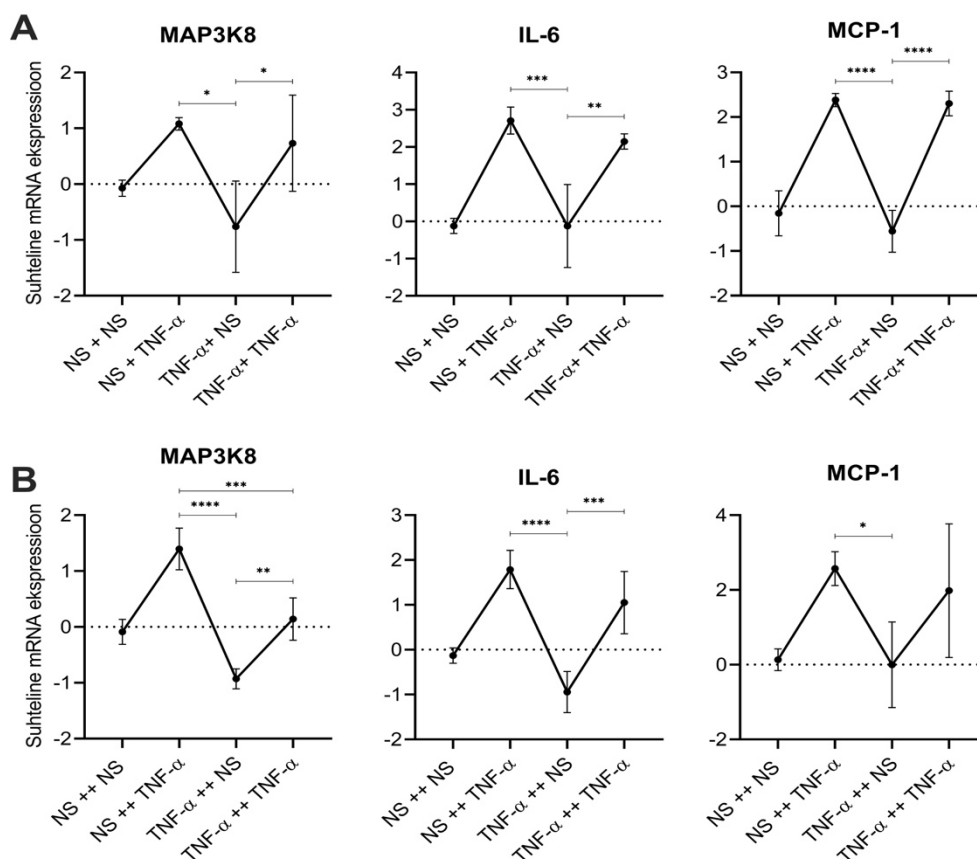


**Joonis 13. IL-6 8-päevane puhkeperioodiga katse.** NHDF rakke stimuleeriti IL-6-ga vastavalt skeemile 8 päeva jooksul. Katse keskel oli puhkeperiood, kus rakud kasvasid puhtas söötmes. Graafikul on võrdluseks stimuleerimata proov (NS, *not stimulated*). Katses on neli erinevat konditsiooni - NS ++ NS, NS ++ IL-6, IL-6 ++ NS ning IL-6 ++ IL-6 (x-telg). Stimulatsioonijärgselt mõõdeti märklaudgeenide *SOCS3* ja *MCP-1* suhtelise mRNA ekspressioonitasemed (y-telg). Graafikutel on fibroblastide keskmine ekspressioon  $\pm$  SD. Kõikide geenide puhul kõikide stimulatsioonidega esines 2 paralleeli.

### 2.3.6 4- ja 8-päevane TNF- $\alpha$ stimulatsioon

Rakke stimuleeriti TNF- $\alpha$ -ga ning seejärel uuriti märklaudgeenide ekspressioonitasemeid: *MAP3K8*, *IL-6* ja *MCP-1*. 4-päevase katse puhul stimuleeriti rakke neljas erinevas konditsioonis: NS + NS, NS + TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  + NS ning TNF- $\alpha$  + TNF- $\alpha$  (joonis 14A). 8-päevases katses on samuti neli erinevat konditsiooni: NS ++ NS, NS ++ TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  ++ NS ning TNF- $\alpha$  ++ TNF- $\alpha$  (joonis 14B). Ekspressioonianalüüsi katseid sooritati kahes korduses, igas katses olid proovid kahes paralleelis (erisused on märgitud jooniste all). Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, mille tulemuste põhjal on nii 4-päevases kui ka 8-päevases katses kõikide geenide puhul statistiliselt oluline erinevus gruppide vahel. Seejärel teostati Tukey test (Lisa 4 ja Lisa 5), mille tulemused on välja toodud ka graafikul (joonis 14). Kuna 4- (joonis 14A) ja 8-päevase (joonis 14B) katse geenid käituvad mõlemad katses sarnaselt, siis edaspidi analüüsitakse neid koos tähistusega ++. 4- ja 8-päevaste katsete puhul võib näha, et mõlema geeni profiilid on sarnased. Geeniekspressioon on märgatavalt tõusnud algul mittestimuleeritud ja hilisemalt 1 tunni stimuleeritud proovi (NS ++ TNF- $\alpha$ ) puhul ning esineb ka statistiline olulisus võrreldes algul päevi stimuleeritud ja hilisemalt mittestimuleeritud

prooviga (TNF- $\alpha$  +[+] NS), mis on kõige madalam. TNF- $\alpha$  +[+] TNF- $\alpha$  on kõrgema tasemega võrreldes TNF- $\alpha$  +[+] NS. Ilmselt ei püsi TNF- $\alpha$  kontsentratsioon terve nädala ja on seetõttu madal, TNF- $\alpha$  lisamisel tõuseb järsult. Näha on ka seda, et TNF- $\alpha$  +[+] TNF- $\alpha$  on pisut madalam, kui NS +[+] TNF- $\alpha$ , mis võib tähendada, et TNF- $\alpha$  tsütokiini lisamisega võib tekkida tolerantsus.

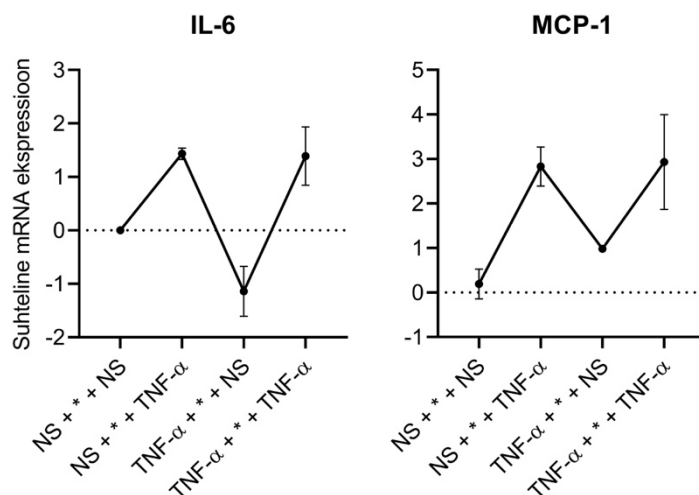


**Joonis 14. TNF- $\alpha$  4- ja 8-päevane katse.** NHDF rakke stimuleeriti tsütokiiniga TNF- $\alpha$ , võrdluseks on toodud stimuleerimata proov (NS, *not stimulated*). (A) 4-päevases katses on kokku neli erinevat konditsiooni – NS + NS, NS + TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  + NS ning TNF- $\alpha$  + TNF- $\alpha$  (x-telg). (B) 8-päevases katses on neli erinevat konditsiooni - NS ++ NS, NS ++ TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  ++ NS ning TNF- $\alpha$  ++ TNF- $\alpha$  (x-telg). Pärast rakkude stimulatsiooni mõõdeti märklaudgeenide *MAP3K8*, *IL-6* ja *MCP-1* suhtelise mRNA ekspressioonitasemed (y-telg). Katseid sooritati kahes korduses, kus igas katses olid proovid kahes paralleelis (kokku 4 paralleeli). V.a 4-päevase katse puhul kõikide geenide NS + TNF- $\alpha$  puhul kasutati tulemustes 3 paralleeli. Graafikutel on NHDF rakkude keskmine ekspressioon  $\pm$  SD. Statistiliseks analüüsiks sooritati Tukey test, kus grupe võrreldi paarikaupa (\* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.01, \*\*\* $p$  < 0.01, \*\*\*\* $p$  < 0.0001). Graafikule ei ole lisatud mittestimuleeritud kontrollproovi p-väärtus võrdluses teiste stimulatsiooni gruppidega, mille võib leida Lisa 4 ning Lisa 5 osadest.



### 2.3.7 8-päevane puhkeperioodiga TNF- $\alpha$ stimulatsioon

Puhkeperioodi katse puhul esinevad geenimustrites kindlad trendid, vaatamata sellele, et statistilist analüüsi ei olnud võimalik teha (joonis 15). Mõlemad geenid on omavahel väga sarnase pildiga. Kahest esimesest katsest eristab antud katset see, et kui nendes oli kõige kõrgem geeniekspressiooni tase algul mittestimuleeritud ja hilisemalt stimuleeritud proovi (NS +[+] TNF- $\alpha$ ) puhul, siis selles katstes on mõlema geeni puhul geeniekspressioonitase kõrge nii mõlemal korral stimuleeritud proovi (TNF- $\alpha$  ++ TNF- $\alpha$ ) kui ka algul mittestimuleeritud ja hilisemalt 1 tund stimuleeritud proovi (NS ++ TNF- $\alpha$ ) puhul. Kuna need tasemed on üpris sarnased, siis tundub, et puhkeperioodiga katse puhul algne rakkude stimulatsioon ei muuda lõplikku ekspressiooni taset. Ilmselt langeb, sarnaselt IL-6 ja IFN- $\alpha$  tsütokiiniga, geeniekspressioonitase TNF- $\alpha$  maha pesemise järgselt ning seetõttu polegi vahet kas esimene stimulatsioon on saadud või ei (joonis 15).



**Joonis 15. TNF- $\alpha$  8-päevane puhkeperioodiga katse.** NHDF rakke stimuleeriti TNF- $\alpha$ -ga vastavalt skeemile 8 päeva jooksul. Lisaks oli katse keskel puhkeperiood ehk rakke inkubeeriti puhtas söötmes. Võrdluseks on graafikul stimuleerimata proov (NS, *not stimulated*). Katses on neli erinevat konditsiooni - NS + \* + NS, NS + \* + TNF- $\alpha$ , TNF- $\alpha$  + \* + NS ning TNF- $\alpha$  + \* + TNF- $\alpha$  (x-telg). Pärast rakkude stimulatsiooni mõõdeti märklaudgeenide *MAP3K8*, *IL-6* ja *MCP-1* suhtelise mRNA ekspressioonitasemed (y-telg). Graafikutel on NHDF rakkude keskmine ekspressioon  $\pm$  SD. Kõikide geenide puhul stimulatsiooniga NS + \* + NS ja TNF- $\alpha$  + \* + TNF- $\alpha$  esineb 3 paralleeli, NS + \* + TNF- $\alpha$  ja TNF- $\alpha$  + \* + NS 2 paralleeli.

## 2.4 Arutelu

Tsütokiinide toime avaldub kiiresti, mille tulemusena tõuseb märklaudgeenide ekspressioon, mis pärast piigi saavutamist taaskord langeb. IL-6 aktiveerib signaalirada ning tõstab geenide ekspressiooni ühe tunni möödudes (Spö Rri et al., 1999). TNF- $\alpha$  indutseerib geenide ekspressiooni kõige varem poole tunni kuni ühe tunni möödudes (Hao ja Baltimore, 2009). IFN- $\alpha$  stimulatsiooni tulemusena tõusevad märklaudgeenide ekspressiooni tasemed nelja tunni möödudes (Moll et al., 2011). Antud kiiret geeniekspressiooni tõusu stimulatsiooni järgselt näeme ka oma tulemustes. Taoline reaktsioon on immuunkaitse seisukohast oluline, et kaitsemehhanisme kiiresti mobiliseerida.

Loomuliku immuunsuse rakkude puhul on täheldatud geeniekspressiooni profiili muutumist põletiku tingimustes. Käesolevas uurimistöös nägime, et fibroblastide stimuleerimisel põletikuliste tsütokiinidega leiab samuti aset geeniekspressiooni muutus. Kuna fibroblastid osalevad põletikuvastuses ja haavade paranemises, siis on nende uurimine oluline antud kontekstis. Fibroblastid toodavad põletikumediaatoreid – tsütokiinid, kemokiinid ja kasvufaktorid (Jordana et al., 1994; Xi et al., 2011). Patogeeni olemasolul sünteesitakse tsütokiine, et teavitada teisi rakke võõrkeha kohalolekust ning aktiveerida immuunreaktsioon. Vastusena infektsioonile on fibroblastid samuti võimelised tootma tsütokiine, sealhulgas IL-6 ja TNF- $\alpha$  (Kirker et al., 2012; Mahanonda et al., 2007).

Antud töös leidsime, et IFN- $\alpha$  vastus erineb IL-6 ja TNF- $\alpha$  vastusest – IFN- $\alpha$  mõju kestab ajaliselt kauem ning antud tsütokiini suhtes ei teki tolerantsus ehk teistkordsel tsütokiini lisamisel jääb märklaudgeenide ekspressioonitase samaks. Märkimisväärne on antud tulemus seetõttu, et kuna IFN- $\alpha$  ning IL-6 kasutavad mõlemad JAK-STAT signaalirada, siis seetõttu oleksime eeldanud sarnast pilti geenide ekspressioonitasemetes, mida me antud juhul ei näinud. Erinevus võib olla seotud tsütokiinide erineva rolliga immuunreaktsiooni korral. IFN- $\alpha$  vastus mimikeerib seda, mis juhtub viirusinfektsiooni korral, samas IL-6 ja TNF- $\alpha$  seda, mis juhtub bakteriaalse infektsiooni puhul. Bakteriaalse infektsiooni korral detekteeriti inimese vere seerumist tunduvalt kõrgemas tasemes IL-6 ja TNF- $\alpha$  hulk võrreldes viirusinfektsiooniga (Holub et al., 2013). Bakteriaalse vastuse korral on peamiseks kaitsemehhanismiks organismis komplemendi aktivatsioon, fagotsütoos (nt makrofaagid) ning põletiku teke. Viiruste vastases võitluses osalevad lisaks interferoonidele ka naturaalsed tapjarakud ning tsütotoksilised T-rakud (Uibo et al., 2015).

IFN- $\alpha$  märklaugeenidena mõõtsime *IFIT1*, *IFI44L*, *RSAD2* ja *CXCL10* ekspressioonitasemeid. 4- ja 8-päevase katse tulemused sarnanesid teineteisele. Katsetulemuste põhjal saab jaotada geenid kahte gruppi – pikaajaline päevi kestev stimulatsioon mõjub sarnaselt lühiajalisele 4-tunnisele stimulatsioonile (*IFI44L*, *RSAD2*) või ei mõju sarnaselt (*IFIT1*, *CXCL10*). *IFI44L* ja *RSAD* geenide puhul nii lühiajaline 4-tunnine stimulatsioon kui ka nädala kestnud stimulatsioon mõlemad tõstsid ekspressioonitaset. Tolerantsust ei tekkinud antud tsütokiini suhtes ehk teistkordsel tsütokiini lisamisel jäi tase samaks või koguni tõusis pisut. Puhkeperioodiga katse puhul nägime, et ööpäevane stimulatsioon ei jäänud püsima mitmepäevase eksperimendi lõpuni, järelikult IFN- $\alpha$  märklaugeenide ekspressiooni tõusuks on vajalik pidev IFN- $\alpha$  tootmine. Hiljutised tööd on leidnud *IFI44L* uudse funktsiooni negatiivselt reguleerida IFN raja vastust (DeDiego et al., 2019). DeDiego et al. näitasid, et *IFI44L* vaigistamine vähendab viiruse produktsiooni, millest tulenevalt võib *IFI44L* toimida negatiivse regulaatorina IFN vastuses (DeDiego et al., 2019). Ka antud bakalaureuse töö tulemused on kooskõlas *IFI44L* negatiivse regulaatori rolliga: *IFI44L* ekspressioon tõusis hilistes ajapunktides, kui teiste geenide ekspressioon juba langes. *IFIT1* ning *CXCL10* geenide 4- ja 8-päevane stimulatsioon erines eelnevatest IFN- $\alpha$  märklaugeenidest, kuna pikaajalise päevi kestnud stimulatsiooni korral oli ekspressioonitase pisut madalam võrreldes mõnetunnise stimulatsiooniga ehk pikaajaline stimulatsioon ei jää püsima nii kaua. Lisaks hakkab tekkima kerge tolerantsuse efekt ehk esimese stimulatsiooni järel teine stimulatsioon annab natuke nõrgema vastuse, kuna rakkude tundlikkus on vähenenud teistkordse stimulatsiooni suhtes (Huber et al., 2017). Varasemate uuringute põhjal on leitud *RSAD2*, *IFI44L* ja *IFIT1* geenide kõrge ekspressioonitase SLE patsientide PBMC rakkudes (Kyogoku et al., 2013). SLE patsientidel on pidevalt kõrge IFN- $\alpha$  tsütokiini tase, millest tulenevalt tekib ISG signatuur ehk ISG kõrge ekspressioon. Lisaks SLE patsientidele leidsid Kyogoku et al, et ka viirusega (kollase palaviku vaktsiiniga immuniseeritud) immuniseeritud tervetel kontrollisikutel tekib samade ISG-de kõrge tase (Kyogoku et al., 2013). Teistest erines aga *CXCL10* geeni ekspressioon, mis osutus SLE-spetsiifiliseks ehk autoimmuunspetsiifiliseks CD4<sup>+</sup> rakkudes ning monotsüütides (Kyogoku et al., 2013). Meie tulemuste põhjal võib väita, et fibroblastides toimub sarnane efekt – IFN- $\alpha$  tõstab sarnaselt ISG-de ekspressiooni, kuid *CXCL10* ekspressioon erineb pisut teistest märklaugeenidest. *CXCL10* kemokiini toodetakse nii infektsiooni kui ka koekahjustuse korral (Jiang et al., 2012). *CXCL10* seondub retseptorile CXCR3 ning reguleerib immuunvastust kutsudes põletikukoldesse erinevaid rakke – leukotsüüte, sealhulgas T-rakke ning monotsüüte ja makrofaage (E. Y. Lee et al., 2009; J. H. Lee et al., 2017). CXCR3 retseptorit ekspresseeritakse eelkõige T-rakkude poolt, aga ka B-rakud, naturaalsed tapjarakud ning dendriitrakud omavad antud retseptorit. Lisaks on leitud CXCR3 retseptorit ka fibroblastidel,

endoteeli- ning epiteelirakkudel (Metzemaekers et al., 2018). RA patsientidel on detekteeritud CXCL10 kõrge tase koevedelikus ning seerumis (Kuan et al., 2010). Lisaks reumatoid artriidi hiiremodelite põhjal on näidatud, et CXCL10-CXCR3 raja blokeerimine inhibeerib rakkude infiltrerumist põletikukoldesse ning vähendab koekahjustust (J. H. Lee et al., 2017). Seega CXCL10 on vajalik infektsiooni korral immuunvastuse reguleerimiseks, kuid selle taset peab hoidma kontrolli all. Antud bakalaureusetöö tulemuste põhjal näeme, et CXCL10 ekspressioonitase tõuseb järsult lühiajalisel stimulatsioonil, kuid samas langeb mõningal määral pikaajalisel stimulatsioonil, mis näitab, IFN- $\alpha$  mõju ei jää püsima tugevalt kõikide geenide puhul. Kokkuvõttes IFN- $\alpha$  stimulatsiooni tulemused varieeruvad erinevate geenide puhul, kuid üldiselt antud tsütokiini juuresolekul ISG geeniekspressioon püsib kõrge pikaajaliselt ning IFN- $\alpha$  tolerantsust ei tekita, sest esimese stimulatsiooni järel teine stimulatsioon jääb samuti enamasti kõrgelt püsima.

Antud tulemuste põhjal nägime, et IL-6 ning TNF- $\alpha$  stimulatsiooni järgne geeniekspressioonimuster erines IFN- $\alpha$  stimulatsiooni indutseeritud ekspressioonidünaamikast. IL-6 ning TNF- $\alpha$  *in vitro* toime ei püsinud nii kaua kui IFN- $\alpha$  oma. Seda võivad põhjustada erinevad mehhanismid – kas IL-6/TNF- $\alpha$  laguneb koekultuuris või kasutatakse rakkude poolt ära. Lisaks tekib IL-6 või TNF- $\alpha$  juuresolekul tolerantsus, aga mitte kõikide geenide osas pole see statistiliselt oluline (võrdleme NS +[+] TS ja TS +[+]TS). Puhkeperioodiga katse tulemused erinesid 4- ja 8-päevaste katsete tulemustest ehk puhkeperioodi järel tundub vastus taastuvat ning kuigi statistiline analüüs pole võimalik, on trend olemas. Katsete tulemuste põhjal võib järeldada, et IL-6 ning TNF- $\alpha$  tsütokiinide toime avaldub kiiresti ning lühiajaliselt. Taoline põletikutsütokiinide kiire ning lühiajaline vastus immuunreaktsioonis on oluline koekahjustuse tekkimise vältimiseks, et tsütokiin ei mõjuks organismis pikaajaliselt. On teada, et TNF- $\alpha$  ülemäärane produtseerimine on seotud mitmete krooniliste põletikuliste ning autoimmuunhaigustega, sealhulgas IBD, psoriaas ning reumatoid artriit (Kopf et al., 2010). Lisaks on näidatud vastuolulisi tulemusi TNF- $\alpha$  inhibiitori kasutamisest sepsise raviks, mida on põhjendatud tsütokiini varajase vastuse ning tsirkuleeriva tsütokiini lühikese poolestusajaga. Kui patsientidele manustatakse TNF- $\alpha$  inhibiitorit, siis on selleks juba hilja, kuna tsütokiini poolestusaeg on läbi, kuid tsütokiin on jõudnud käivitada põletikulise kaskaadi (Clark, 2007). SOCS3 on JAK-STAT signaaliraja negatiivne regulaator, mis mängib olulist rolli erinevate infektsioonide ja autoimmuunhaiguste korral. SOCS3 inhibeerib JAK1, JAK2 ning TYK2-e, blokeerides substraadi seondumiskohad kinaasil (Babon et al., 2012). Hiiremodelitel on näidatud, et SOCS3 puudulikkus põhjustab raskekujuliste põletikuliste haiguste teket (Croker et al., 2004). Lisaks SOCS3 vähendab liigesepõletikku artriiti põdevates hiirtes inhibeerides IL-

6 signalisatsiooni (Shouda et al., 2001). Sellest tulenevalt võib spekuloida, et antud töö IL-6 lühiajaline mõju võib olla ka tingitud negatiivsest regulatsioonist SOCS3-e kaudu.

Häired tsütokiinide tootmises, nagu näiteks ületootmine, võivad põhjustada erinevaid tervisele ohtlikke seisundeid. Tsütokiinitorm on situatsioon, kus infektsioonide tagajärjel hakatakse põletikutsütokiine liigselt tootma (Tisoncik et al., 2012), millest võib välja areneda süsteemne põletik ning äge respiratoorne distressi sündroomi (Tisoncik et al., 2012). Üheks aktuaalseks näiteks on globaalset pandeemiat põhjustanud SARS-CoV-2, mille tulemusena areneb välja haigus COVID-19 (Zhang et al., 2020). Antud töö tulemuste põhjal näeme, et IL-6 ja TNF- $\alpha$  toime ei püsi pikaajaliselt, kuid vaatamata sellele võib siiski tekkida tsütokiinitorm, kuna tsütokiini toodetakse palju ja pidevalt peale. Tsütokiinide üleproduktsiooni takistamiseks on võimalik neid inhibeerida. Ühe võimaliku ravimina uuritakse IL-6R monokloonsete antikehade ehk Tocilizumabi (TCZ) kasutamist, mis inhibeerib IL-6 retseptorit (Fu et al., 2020; Sciascia et al., 2020). Vastupidiselt inhibeerimisele on uuritud IFN- $\alpha$ , kui antiviraalse tsütokiini, kasutamist COVID-19 haiguse ravis (Zhou et al., 2020). Kirjandusest on teada, et pikaajaline IFN- $\alpha$  kõrge tase võib põhjustada erinevaid tüsistusi ja autoimmuunhaigusi, nagu luupus ja reumatoidartriit (Muskardin ja Niewold, 2018). Lisaks on suur hulk varasemaid uuringuid näidanud, et IFN- $\alpha$  teraapia võib põhjustada kõrvalnähte, nagu näiteks gripi-laadsed sümptomid, hematoloogiline toksilisus, iiveldus ja väsimus (Sleijfer et al., 2005). Seetõttu on ravimi väljatöötamisel oluline põhjalikult uurida IFN- $\alpha$  toimet. Huvitav on asjaolu, et hiljutiste uuringute põhjal kasutab SARS-CoV-2 rakku sisenemiseks retseptorit ACE2 (Ziegler et al., 2020). ACE2 on ISG. Sellest tulenevalt võib IFN- $\alpha$  stimuleerimine potentsiaalselt veelgi enam soodustada SARS-CoV-2 rakku sisenemist, kuna IFN- $\alpha$  indutseerib ACE2 ekspressiooni (Ziegler et al., 2020). Seda enam peab suhtuma ettevaatlikkusega IFN- $\alpha$  terapeutilisel kasutamisel.

## KOKKUVÕTE

Tsütokiinid on rakkude poolt sünteesitavad valgulised signaalmolekulid, mis omavad rolli põletiku ja immuunvastuse reguleerimisel ning samuti kudede kahjustuse tekkel ja paranemisel. Loomuliku immuunsuse rakkude puhul on täheldatud geeniekspressiooni profiili muutumist põletiku tingimustes. Tsütokiinide reaktsioon põletiku puhul on immuunkaitse seisukohast oluline, et kaitsemehhanisme kiiresti mobiliseerida. Lisaks loomuliku immuunsuse rakkudele osalevad põletikuvastuses ka fibroblastid, kuid nende rakkude rolli põletikuvastuse moduleerimisel on vähe uuritud.

Käesoleva töö eesmärk oli uurida geeniekspressiooni muutusi fibroblastides tsütokiinide korduval stimuleerimisel. Esmalt leidsime markergeenide ekspressioonitasemete mõõtmise kaudu optimaalse ajavahemiku fibroblastide IFN- $\alpha$ , IL-6 ning TNF- $\alpha$  tsütokiinidega stimuleerimiseks. Seejärel uurisime fibroblastide võimet vastata IFN- $\alpha$ , IL-6 ning TNF- $\alpha$  tsütokiinidele, pärast eelnevat stimulatsiooni (koos puhkeperioodiga või ilma) samade tsütokiinidega.

Käesoleva tööga kinnitasime hüpoteesi, et fibroblastide korduval stimulatsioonil tsütokiinidega muutuvad geeniekspressiooni tasemed võrreldes esmase stimulatsiooniga. 4- ja 8-päevase katse tulemused sarnanesid teineteisele. IFN- $\alpha$  stimulatsiooni tulemused varieerusid erinevate geenide puhul, kuid üldiselt püsis antud tsütokiini juuresolekul ISG geeniekspressioon pikaajaliselt kõrge ning IFN- $\alpha$  ei tekitanud tolerantsust, sest esimese stimulatsiooni järel teine stimulatsioon jäi samuti enamasti kõrgelt püsima. Antud tulemuste põhjal nägime, et IL-6 ning TNF- $\alpha$  stimulatsiooni järgne geeniekspressioonimuster erines IFN- $\alpha$  stimulatsiooni indutseeritud ekspressioonidünaamikast. IL-6 ning TNF- $\alpha$  *in vitro* toime ei püsinud nii kaua kui IFN- $\alpha$  oma. Katsete tulemuste põhjal võis järeldada, et IL-6 ning TNF- $\alpha$  tsütokiinide toime avaldus kiiresti ning lühiajaliselt. Samuti täheldasime, et puhkeperioodiga katsete puhul käitusid kõik tsütokiinid sarnaselt ja tolerantsust ei tekkinud, ehk peale puhkeperioodi puhtas söötmes, taastus fibroblastide vastus uuele stimuleerimisele.

# SUMMARY

## Gene expression changes in fibroblasts during repeated stimulation with cytokines

Katrina Ahun

Cytokines are small proteins, produced by leucocytes and other cells, that function as signalling molecules and regulate inflammatory response and different immune reactions. After cytokine binding to its receptor, signalling pathways are activated and gene expression is initiated by transcription factor binding to the promotor. It has been reported that gene expression changes in immune cells during inflammation. The effects of cytokines manifest quickly, as a result of which target gene expression is upregulated and after reaching its peak, downregulated again. That kind of reaction is important for mobilising the immune system's defence mechanisms quickly. Besides immune cells, fibroblasts play an important role in cytokine production and inflammatory processes as well. Since their most well-known function is forming tissue support structures, their contribution to inflammatory processes is not that widely studied. However, since fibroblasts do also play a role in inflammatory response and wound healing, it is very important to study them in this context.

In this study it was hypothesised, that repeated fibroblast stimulation with cytokines changes gene expression levels in comparison to the original stimulation. The goals of the study were finding an optimal timeframe for IFN- $\alpha$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  cytokine stimulation in fibroblasts by measuring target gene expression and evaluating the ability of fibroblasts to respond to IFN- $\alpha$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  cytokines after previous stimulation (with or without a rest period) with the same cytokines.

In this study, we were able to confirm the hypothesis that repeated fibroblast stimulation with cytokines changes gene expression levels in comparison to the original stimulation. Both 4-day and 8-day experiment results were similar. IFN- $\alpha$  stimulation results vary by genes, but generally IFN- $\alpha$  exhibits a long-lasting effect on gene expression upregulation and does not cause tolerance, i.e. a second stimulation performed after the first one results in highly upregulated gene expression as well. We were able to see that IL-6 and TNF- $\alpha$  cytokine stimulation gene expression patterns were different from IFN- $\alpha$ . IL-6 and TNF- $\alpha$  in vitro stimulation did not result in a long-lasting effect, such as in the case of IFN- $\alpha$ , meaning IL-6 and TNF- $\alpha$  effects manifest very quickly. We also saw, that in the 8-day stimulation with a rest period, all the cytokines behaved similarly and did not cause tolerance, meaning that after the rest period in clean medium, the fibroblast regained their ability to respond to a new stimulation.

## TÄNUSÕNAD

Kõige suuremaid tänusõnu väärrib esmalt muidugi minu juhendaja Epp Kaleviste, kes oli mulle töö koostamisel suureks toeks, abiks ja eeskujuks ning alati upitas mind asju paremini tegema. Aitäh, et olid minuga alati nii kannatlik ja sõbralik. Ning Kai Kisand heade paranduste ning vihjete eest.

Tahaksin veel tänada meie uurimisgrupi juhti Pärt Petersoni, kes mind lahkelt oma laborisse vastu võttis ja nii huvitava teema ning ägedate inimestega kokku viis. Lisaks tahaksin tänada kõiki meie uurimisgrupi liikmeid nende igakülgse abi eest ükskõik mis murega. Erilist ära märkimist väärrib kindlasti Hanna Sein, kellel polnud kunagi probleemiks minuga näiteks mu kadunud proove otsima minna või mõni uus metoodika selgeks õpetada. Viimaseks tänan oma pere ja sõpru, kes olid alati igatpidi toeks.



## KASUTATUD KIRJANDUS

- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: A double-edged sword. *Nature Reviews Immunology* 3: 745–756.
- Alessandri, A. L., Sousa, L. P., Lucas, C. D., Rossi, A. G., Pinho, V., and Teixeira, M. M. (2013). Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology and Therapeutics*. 139: 189–212.
- Ansel, J. C., Kaynard, A. H., Armstrong, C. A., Olerud, J., Bunnett, N., and Payan, D. (1996). Skin-Nervous system interactions. *Journal of Investigative Dermatology*. 106: 198–204.
- Babon, J. J., Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Varghese, L. N., Laktyushin, A., Young, S. N., Lucet, I. S., Norton, R. S., and Nicola, N. A. (2012). Suppression of Cytokine Signaling by SOCS3: Characterization of the Mode of Inhibition and the Basis of Its Specificity. *Immunity*. 36: 239–250.
- Barton, G. M. (2008). A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system. *Journal of Clinical Investigation*. 118: 413–420.
- Basyte-Bacevice, V., and Kupcinskas, J. (2020). Evolution and Revolution of Hepatitis C Management: From Non-A, Non-B Hepatitis Toward Global Elimination. *Digestive Diseases*. 38: 137–142.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L., and Kuchroo, V. K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 441: 235–238.
- Boehncke, W. H. (2018). Systemic inflammation and cardiovascular comorbidity in psoriasis patients: Causes and consequences. *Frontiers in Immunology*. 9: 579.
- Boraschi, D., and Tagliabue, A. (2013). The interleukin-1 receptor family. *Seminars in Immunology*. 25: 394–407.
- Bradley, J. (2008). TNF-mediated inflammatory disease. *The Journal of Pathology*. 214: 149–160.
- Brouty-Boyé, D., Pottin-Clémenceau, C., Doucet, C., Jasmin, C., and Azzarone, B. (2000). Chemokines and CD40 expression in human fibroblasts. *European Journal of Immunology*. 30: 914–919.
- Calò, V., Migliavacca, M., Bazan, V., Macaluso, M., Buscemi, M., Gebbia, N., and Russo, A. (2003). STAT proteins: From normal control of cellular events to tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*. 197: 157–168.
- Cascieri, M. A., and Springer, M. S. (2000). The chemokine/chemokine-receptor family: Potential and progress for therapeutic intervention. *Current Opinion in Chemical Biology*.

4: 420–427.

- Chandrasekharan, U. M., Siemionow, M., Unsal, M., ... DiCorleto, P. E. (2007). Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) receptor-II is required for TNF- $\alpha$ -induced leukocyte-endothelial interaction in vivo. *Blood*. 109: 1938–1944.
- Cheng, X., Shen, Y., and Li, R. (2014). Targeting TNF: A therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Drug Discovery Today*. 19: 1822–1827.
- Chow, D. C., He, X. L., Snow, A. L., Rose-John, S., and Christopher Garcia, K. (2001). Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science*, 291: 2150–2155.
- Choy, E. H., De Benedetti, F., Takeuchi, T., Hashizume, M., John, M. R., and Kishimoto, T. (2020). Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nature Reviews Rheumatology*. 16: 335–345.
- Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997). Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science*. 278: 1803–1805.
- Chung, K. F. (2012). Inflammatory biomarkers in severe asthma. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*. 18: 35–41.
- Chyuan, I.-T., Tzeng, H.-T., and Chen, J.-Y. (2019). Signaling Pathways of Type I and Type III Interferons and Targeted Therapies in Systemic Lupus Erythematosus. *Cells*, 8: 963.
- Clark, I. A. (2007). How TNF was recognized as a key mechanism of disease. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 18: 335–343.
- Croker, B. A., Metcalf, D., Robb, L., ... Roberts, A. W. (2004). SOCS3 Is a Critical Physiological Negative Regulator of G-CSF Signaling and Emergency Granulopoiesis. *Immunity*. 20: 153–165.
- DeDiego, M. L., Martinez-Sobrido, L., and Topham, D. J. (2019). Novel Functions of IFI44L as a Feedback Regulator of Host Antiviral Responses. *Journal of Virology*. 93.e01159-19.
- Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B. E. (2009). Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): An overview. *Journal of Interferon and Cytokine Research*. 29: 313–325.
- Detmar, M. (1996). Molecular regulation of angiogenesis in the skin. *Journal of Investigative Dermatology*. 106: 207–208.
- Diamond, M. S. (2014). IFIT1: A dual sensor and effector molecule that detects non-2'-O methylated viral RNA and inhibits its translation. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 25: 543–550.
- Dinarello, C. A. (2000). Proinflammatory cytokines. *Chest*. 118: 503–508.
- Driskell, R. R., and Watt, F. M. (2015). Understanding fibroblast heterogeneity in the skin.

- Trends in Cell Biology. 25: 92–99.
- Du, Z., Wei, L., Murti, A., Pfeffer, S. R., Fan, M., Yang, C. H., and Pfeffer, L. M. (2007). Non-conventional signal transduction by type 1 interferons: The NF- $\kappa$ B pathway. *Journal of Cellular Biochemistry*. 102: 1087–1094.
- Dufour, J. H., Dziejman, M., Liu, M. T., Leung, J. H., Lane, T. E., and Luster, A. D. (2002). IFN- $\gamma$ -Inducible Protein 10 (IP-10; CXCL10)-Deficient Mice Reveal a Role for IP-10 in Effector T Cell Generation and Trafficking. *The Journal of Immunology*. 168: 3195–3204.
- Eming, S. A., Martin, P., and Tomic-Canic, M. (2014). Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Science Translational Medicine*. 6.
- Foxwell, B. M. J., Barret, K., and Feldmann, M. (2008). Cytokine receptors: structure and signal transduction. *Clinical & Experimental Immunology*. 90: 161–169.
- Fu, B., Xu, X., and Wei, H. (2020). Why tocilizumab could be an effective treatment for severe COVID-19? *Journal of Translational Medicine*. 18: 164.
- Galli, S. J., Borregaard, N., and Wynn, T. A. (2011). Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nature Immunology*. 12: 1035–1044.
- Garbers, C., Hermanns, H. M., Schaper, F., Müller-Newen, G., Grötzinger, J., Rose-John, S., and Scheller, J. (2012). Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 23: 85–97.
- Goodbourn, S., Didcock, L., and Randall, R. E. (2000). Interferons: Cell signalling, immune modulation, antiviral responses and virus countermeasures. *Journal of General Virology* 81: 2341–2364.
- Guo, Y., Xu, F., Lu, T., Duan, Z., and Zhang, Z. (2012). Interleukin-6 signaling pathway in targeted therapy for cancer. *Cancer Treatment Reviews*. 38: 904–910.
- Hajimiri, M., Shahverdi, S., Kamalinia, G., and Dinarvand, R. (2015). Growth factor conjugation: Strategies and applications. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 103: 819–838.
- Hansen, G., Hercus, T. R., McClure, ... Parker, M. W. (2008). The Structure of the GM-CSF Receptor Complex Reveals a Distinct Mode of Cytokine Receptor Activation. *Cell*. 134: 496–507.
- Hao, S., and Baltimore, D. (2009). The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules. *Nature Immunology*, 10: 281–288.
- Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2014). Regulation of NF- $\kappa$ B by TNF family cytokines. *Seminars in Immunology*: 26: 253–266.
- Heinrich, P. C., Castell, J. V., and Andus, T. (1990). Interleukin-6 and the acute phase response.

- Biochemical Journal. 265: 621–636.
- Holub, M., Lawrence, D. A., Andersen, N., Davidová, A., Beran, O., Marešová, V., and Chalupa, P. (2013). Clinical Study Cytokines and Chemokines as Biomarkers of Community-Acquired Bacterial Infection. *Mediators of Inflammation*, 2013:190145.
- Huber, R., Bikker, R., Welz, B., Christmann, M., and Brand, K. (2017). TNF Tolerance in Monocytes and Macrophages: Characteristics and Molecular Mechanisms. *Journal of Immunology Resolution*, 2017: 9570129.
- Idriss, H. T., and Naismith, J. H. (2000). TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microscopy Research and Technique*. 50: 184–195.
- Imada, K., and Leonard, W. J. (2000). The Jak-STAT pathway. *Molecular Immunology*. 37: 1–11.
- Ivashkiv, L. B., and Donlin, L. T. (2014). Regulation of type i interferon responses. *Nature Reviews Immunology*. 14: 36–49.
- Jiang, D., Liang, J., Guo, R., ... Noble, P. W. (2012). Long-term exposure of chemokine CXCL10 causes bronchiolitis-like inflammation. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*. 46: 592–598.
- Johnson, D. E., O’Keefe, R. A., and Grandis, J. R. (2018). Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signalling axis in cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*. 15: 234–248.
- Jordana, M., Sarnstrand, B., Sime, P. J., and Ramis, I. (1994). Immune-inflammatory functions of fibroblasts. *European Respiratory Journal*. 7: 2212–2222.
- Kawai, T., and Akira, S. (2010). The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on toll-like receptors. *Nature Immunology*. 11: 373–384.
- Kessler-Becker, D., Krieg, T., and Eckes, B. (2004). Expression of pro-inflammatory markers by human dermal fibroblasts in a three-dimensional culture model is mediated by an autocrine interleukin-1 loop. *Biochemistry Journal*. 379: 351–358.
- Kirou, K. A., and Gkrouzman, E. (2013). Anti-interferon alpha treatment in SLE. *Clinical Immunology*. 148: 303–312.
- Kopf, M., Bachmann, M. F., and Marsland, B. J. (2010). Averting inflammation by targeting the cytokine environment. *Nature Reviews Drug Discovery*. 9: 703–718.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2009). IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. 27: 485–517.
- Kirker, K. R., James, G. A., Fleckman, P., Olerud, J. E., Stewart, P. S. (2012). Differential Effects of Planktonic and Biofilm MRSA on Human Fibroblasts. *Wound Repair and Regeneration*. 20: 253–261.
- Kuan, W. P., Tam, L. S., Wong, C. K., Ko, F. W. S., Li, T., Zhu, T., and Li, E. K. (2010). CXCL

- 9 and CXCL 10 as sensitive markers of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *Journal of Rheumatology*. 37: 257–264.
- Kyogoku, C., Smiljanovic, B., Grün, J. R., Biesen, R., Schulte-Wrede, U., Häupl, T., Hiepe, F., Alexander, T., Radbruch, A., and Grützkau, A. (2013). Cell-specific type I IFN signatures in autoimmunity and viral infection: What makes the difference? *PLoS ONE*. 8:e83776.
- Lee, E. Y., Lee, Z. H., and Song, Y. W. (2009). CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*. 8: 379–383.
- Lee, J. H., Kim, B., Jin, W. J., Kim, H. H., Ha, H., and Lee, Z. H. (2017). Pathogenic roles of CXCL10 signaling through CXCR3 and TLR4 in macrophages and T cells: Relevance for arthritis. *Arthritis Research and Therapy*. 19: 163.
- Levy, D. E., and Darnell, J. E. (2002). STATs: Transcriptional control and biological impact. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 3: 651–662.
- Levy, D. E., and Lee, C. (2002). What does Stat3 do? *Journal of Clinical Investigation*. 109: 1143–1148.
- Livak, K. J., and Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2 C T Method. *METHODS*. 25: 402–408.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. *Cell*. 104: 87–501.
- Luo, Y., and Zheng, S. G. (2016). Hall of fame among pro-inflammatory cytokines: Interleukin-6 gene and its transcriptional regulation mechanisms. *Frontiers in Immunology*. 7: 604.
- Lynch, M. D., and Watt, F. M. (2018). Fibroblast heterogeneity: implications for human disease. *Journal of Clinical Investigation*. 128: 26–35.
- Mahanonda, R., Sa-Ard-Iam, N., Montreekashon, P., Pimkhaokham, A., Yongvanishit, K., Fukuda, M. M., Pichyangkul, S. (2007). IL-8 and IDO Expression by Human Gingival Fibroblasts via TLRs. *Journal of Immunology*. 178: 1151-1157.
- Mathew, S. J., Haubert, D., Krönke, M., and Leptin, M. (2009). Looking beyond death: A morphogenetic role for the TNF signalling pathway. *Journal of Cell Science*. 122: 1939–1946.
- Medzhitov, R. (2008). Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*. 454: 428–435.
- Medzhitov, R. (2010). Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. *Cell*. 140: 771–776.
- Megjugorac, N. J., Young, H. A., Amrute, S. B., Olshalsky, S. L., and Fitzgerald-Bocarsly, P. (2004). Virally stimulated plasmacytoid dendritic cells produce chemokines and induce migration of T and NK cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 75: 504–514.
- Metzemaekers, M., Vanheule, V., Janssens, R., Struyf, S., and Proost, P. (2018). Overview of

- the mechanisms that may contribute to the non-redundant activities of interferon-inducible CXC chemokine receptor 3 ligands. *Frontiers in Immunology*. 8: 1970.
- Moll, H. P., Maier, T., Zommer, A., Lavoie, T., and Brostjan, C. (2011). The differential activity of interferon- $\alpha$  subtypes is consistent among distinct target genes and cell types. *Cytokine*. 53: 52–59.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., and O’Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*. 19: 683–765.
- Moots, R. J., Curiale, C., Petersel, D., Rolland, C., Jones, H., and Mysler, E. (2018). Efficacy and Safety Outcomes for Originator TNF Inhibitors and Biosimilars in Rheumatoid Arthritis and Psoriasis Trials: A Systematic Literature Review. *BioDrugs*. 32: 193–199.
- Moulton, V. R., Suarez-Fueyo, A., Meidan, E., Li, H., Mizui, M., and Tsokos, G. C. (2017). Pathogenesis of Human Systemic Lupus Erythematosus: A Cellular Perspective. *Trends in Molecular Medicine*. 23: 615–635.
- Muskardin, T. L. W., and Niewold, T. B. (2018). Type I interferon in rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*. 14: 214–228.
- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: Challenges and opportunities. *Nature Reviews Immunology*. 6: 173–182.
- Palata, O., Podzimkova, N. H., Nedvedova, E., Umprecht, A., Sadilkova, L., Jelinkova, L. P., Spisek, R., and Adkins, I. (2019). Radiotherapy in combination with cytokine treatment. *Frontiers in Oncology*. 9.
- Parsonage, G., Filer, A. D., Haworth, O., Nash, G. B., Rainger, G. E., Salmon, M., and Buckley, C. D. (2005). A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends in Immunology*. 26: 150–156.
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*. 5: 375–386.
- Prchal, M., Pilz, A., Simma, O., Lingnau, K., von Gabain, A., Strobl, B., Müller, M., and Decker, T. (2009). Type I interferons as mediators of immune adjuvants for T- and B cell-dependent acquired immunity. *Vaccine*. 27: G17–G20.
- Sanz-Garcia, C., Sánchez, Á., Contreras-Jurado, ... Alemany, S. (2017). Map3k8 modulates monocyte state and atherogenesis in ApoE  $-/-$  mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 37: 237–246.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011). The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*. 1813: 878–888.
- Scheller, J., Grötzinger, J., and Rose-John, S. (2006). Updating interleukin-6 classic- and trans-

- signaling. *Signal Transduction*. 6: 240–259.
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., and Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 513–545.
- Sciascia, S., Aprà, F., Baffa, A., ... Rossi, D. (2020). Pilot prospective open, single-arm multicentre study on off-label use of tocilizumab in patients with severe COVID-19. *Clinical and Experimental Rheumatology*. 38: 559-532.
- Seif, F., Khoshmirsafa, M., Aazami, H., Mohsenzadegan, M., Sedighi, G., and Bahar, M. (2017). The role of JAK-STAT signaling pathway and its regulators in the fate of T helper cells. *Cell Communication and Signaling*. 15: 23.
- Sennett, R., and Rendl, M. (2012). Mesenchymal-epithelial interactions during hair follicle morphogenesis and cycling. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 23: 917–927.
- Sherwood, E. R., and Toliver-Kinsky, T. (2004). Mechanisms of the inflammatory response. *Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology*. 18: 385–405.
- Shin, M. L., Lieberman, A. P., and Fisher, S. N. (1993). Methodological Evaluation of Tumor Necrosis Factor Production in Central Nervous System Glial Cells. *Methods in Neurosciences*. 17: 16–34.
- Shouda, T., Yoshida, T., Hanada, ... Yoshimura, A. (2001). Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *Journal of Clinical Investigation*. 108: 1781–1788.
- Silzle, T., Randolph, G. J., Kreutz, M., and Kunz-Schughart, L. A. (2004). The fibroblast: Sentinel cell and local immune modulator in tumor tissue. *International Journal of Cancer*. 108: 173–180.
- Sleijfer, S., Bannink, M., Gool, A. R., Kruit, W. H. J., and Stoter, G. (2005). Side Effects of Interferon- $\alpha$  Therapy. *Pharmacy World & Science*. 27: 423–431.
- Smola, H., Thiekotter, G., and Fusenig, N. E. (1993). Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *Journal of Cell Biology*. 122: 417–429.
- Snick, J. Van. (1990). Interleukin-6: an overview. *Annual Review of Immunology*. 8: 253-278.
- Solis, M., Goubau, D., Romieu-Mourez, R., Genin, P., Civas, A., and Hiscott, J. (2006). Distinct functions of IRF-3 and IRF-7 in IFN- $\alpha$  gene regulation and control of anti-tumor activity in primary macrophages. *Biochemical Pharmacology*. 72: 1469–1476.
- Sorrell, J. M., and Caplan, A. I. (2004). Fibroblast heterogeneity: More than skin deep. *Journal of Cell Science*. 117: 667–675.
- Spö Rri, B., Mü Ller, K. M., Wiesmann, U., and Bickel, M. (1999). Soluble IL-6 receptor induces calcium flux and selectively modulates chemokine expression in human dermal fibroblasts. *International Immunology*. 11: 1053-1058.

- Stark, G. R., and Darnell, J. E. (2012). The JAK-STAT Pathway at Twenty. *Immunity*. 36: 503–514.
- Strbo, N., Yin, N., and Stojadinovic, O. (2014). Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. *Advances in Wound Care*. 3: 492–501.
- Tanaka, T., Narazaki, M., and Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 6.a016295.
- Taniguchi, K., and Karin, M. (2014). IL-6 and related cytokines as the critical lynchpins between inflammation and cancer. *Seminars in Immunology*. 26: 54–74.
- Thyrell, L., Arulampalam, V., Hjortsberg, L., Farnebo, M., Grandér, D., and Pokrovskaja Tamm, K. (2007). Interferon alpha induces cell death through interference with interleukin 6 signaling and inhibition of STAT3 activity. *Experimental Cell Research*. 313: 4015–4024.
- Tisoncik, J. R., Korth, M. J., Simmons, C. P., Farrar, J., Martin, T. R., and Katze, M. G. (2012). Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 76: 16–32.
- Trengove, M. C., and Ward, A. C. (2013). Review Article SOCS proteins in development and disease. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*. 2: 1–29.
- Uibo R., Kisand K., Peterson P., Reimand K. (2015). *Immunoloogia. Õpik kõrgkoolidele*. p. 86-89, 146-163. Tartu Ülikooli Kirjastus, Eesti.
- Vestweber, D. (2015). How leukocytes cross the vascular endothelium. *Nature Reviews Immunology*. 15: 692–704.
- Waldburger, J. M., and Firestein, G. S. (2009). Garden of therapeutic delights: New targets in rheumatic diseases. *Arthritis Research and Therapy*. 11: 206.
- Wang, X., Lupardus, P., LaPorte, S. L., and Garcia, K. C. (2009). Structural Biology of Shared Cytokine Receptors. *Annual Review of Immunology*. 27: 29–60.
- Wang, X., Rickert, M., and Garcia, K. C. (2005). Structural biology: Structure of the quaternary complex of interleukin-2 with its  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ c receptors. *Science*. 310: 1159–1163.
- Werner, S., and Smola, H. (2001). Paracrine regulation of keratinocyte proliferation and differentiation. *Trends in Cell Biology*. 11: 143–146.
- Whiteside, T. L. (1994). Cytokines and cytokine measurements in a clinical laboratory. *Clinical and Vaccine Immunology*. 1: 257-260.
- Wilgus, T. A., Roy, S., and McDaniel, J. C. (2013). Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Advances in Wound Care*. 2: 379–388.
- Xi, X., McMillan, D. H., Lehmann, G. M., Sime, P. J., Libby, R. T., Huxlin, K. R., Feldon, S. E., and Phipps, R. P. (2011). Ocular Fibroblast Diversity: Implications for Inflammation



- and Ocular Wound Healing. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 52: 4859-4865.
- Zelová, H., and Hošek, J. (2013). TNF- $\alpha$  signalling and inflammation: Interactions between old acquaintances. *Inflammation Research*. 62: 641–651.
- Zhang, W., Zhao, Y., Zhang, F., ... Zhang, S. (2020). The use of anti-inflammatory drugs in the treatment of people with severe coronavirus disease 2019 (COVID-19): The experience of clinical immunologists from China. *Clinical Immunology*. 214.108393.
- Zhao, L. J., Hua, X., He, S. F., Ren, H., and Qi, Z. T. (2011). Interferon alpha regulates MAPK and STAT1 pathways in human hepatoma cells. *Virology Journal*. 8: 157.
- Zhou, Q., Chen, V., Shannon, C. P., Wei, X.-S., Xiang, X., Wang, X., Wang, Z.-H., Tebbutt, S. J., Kollmann, T. R., and Fish, E. N. (2020). Interferon- $\alpha$ 2b Treatment for COVID-19. *Frontiers in Immunology*. 11: 1061.
- Ziegler, C., Allon, S. J., Nyquist, S. K., ... Ordovas-Montanes, J. (2020). SARS-CoV-2 Receptor ACE2 is an Interferon-Stimulated Gene in Human Airway Epithelial Cells and Is Enriched in Specific Cell Subsets Across Tissues. 281: 1016-1035.

## KASUTATUD VEEBIAADRESSID

1. <https://epidermolysisbullosanews.com/2018/03/26/fibroblasts-skin-injections-better-wound-healing-closure-study/> - külastatud 02.04.2020

## LISAD

**Lisa 1. IFN- $\alpha$  4 päevase katse p-väärtused.** Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, kus võrreldi kõiki gruppe koos. Spetsiifilisemaks analüüsiks viidi läbi Tukey test, kus võrreldi gruppe paarikaupa. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Test	Võrdlus	IFIT1	IFI44L	RSAD2	CXCL10
ANOVA	Kõik proovid korraga	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Tukey	NS + NS vs NS + IFN- $\alpha$	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	NS + NS vs IFN- $\alpha$ + NS	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001
	NS + NS vs IFN- $\alpha$ + IFN- $\alpha$	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	NS + IFN- $\alpha$ vs IFN- $\alpha$ + NS	0.0216	0.0060	0.9022	<0.0001
	NS + IFN- $\alpha$ vs IFN- $\alpha$ + IFN- $\alpha$	0.0742	0.0045	0.5948	0.0009
	IFN- $\alpha$ + NS vs IFN- $\alpha$ + IFN- $\alpha$	0.9618	0.9589	0.8996	0.1797

**Lisa 2. IFN- $\alpha$  8 päevase katse p-väärtused.** Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, kus võrreldi kõiki gruppe koos. Spetsiifilisemaks analüüsiks viidi läbi Tukey test, kus võrreldi gruppe paarikaupa. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Test	Võrdlus	IFIT1	IFI44L	RSAD2	CXCL10
ANOVA	Kõik proovid korraga	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Tukey	NS ++ NS vs NS ++ IFN- $\alpha$	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	NS ++ NS vs IFN- $\alpha$ ++ NS	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	NS ++ NS vs IFN- $\alpha$ ++ IFN- $\alpha$	<0.0001	<0.0001	<0.0001	0.0001
	NS ++ IFN- $\alpha$ vs IFN- $\alpha$ ++ NS	0,0082	0,5694	0,9979	<0,0001
	NS ++ IFN- $\alpha$ vs IFN- $\alpha$ ++ IFN- $\alpha$	0,1046	0,0716	0,9771	0,0005
	IFN- $\alpha$ ++ NS vs IFN- $\alpha$ ++ IFN- $\alpha$	0,4844	0,4997	0,9362	0,2104

**Lisa 3. IL-6 4 päevase katse p-väärtused.** Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, kus võrreldi kõiki gruppe koos. Spetsiifilisemaks analüüsiks viidi läbi Tukey test, kus võrreldi gruppe paarikaupa. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Test	Võrdlus	SOCS3	MCP-1
ANOVA	Kõik proovid korraga	0.0101	<0.0001
Tukey	NS + NS vs NS + IL-6	0,0206	0,0006
	NS + NS vs IL-6 + NS	0,9920	0,5456
	NS + NS vs IL-6 + IL-6	0,9238	0,4052
	NS + IL-6 vs TS + NS	0,0126	<0,0001
	NS + IL-6 vs IL-6 + IL-6	0,0605	0,0081
	IL-6 + NS vs IL-6 + IL-6	0,8058	0,0492

**Lisa 4. TNF- $\alpha$  4 päevase katse p-väärtused.** Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, kus võrreldi kõiki gruppe koos. Spetsiifilisemaks analüüsiks viidi läbi Tukey test, kus võrreldi gruppe paarikaupa. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

Test	Võrdlus	MAP3K8	IL-6	MCP-1
ANOVA	Kõik proovid korraga	0.0094	<0.0001	<0.0001

Tukey	NS + NS vs NS + TNF- $\alpha$	0,1330	0,0005	<0,0001
	NS + NS vs TNF- $\alpha$ + NS	0,4396	>0,9999	0,5015
	NS + NS vs TNF- $\alpha$ + TNF- $\alpha$	0,3167	0,0015	<0,0001
	NS + TNF- $\alpha$ vs TNF- $\alpha$ + NS	0,0123	0,0005	<0,0001
	NS + TNF- $\alpha$ vs TNF- $\alpha$ + TNF- $\alpha$	0,8848	0,6477	0,9936
	TNF- $\alpha$ + NS vs TNF- $\alpha$ + TNF- $\alpha$	0,0272	0,0015	<0,0001

**Lisa 5. TNF- $\alpha$  8 päevase katse p-väärtused.** Statistiliseks analüüsiks sooritati ühepoolne ANOVA test, kus võrreldi kõiki gruppe koos. Spetsiifilisemaks analüüsiks viidi läbi Tukey test, kus võrreldi gruppe paarikaupa. \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.01, \*\*\*\*p < 0.0001.

Test	Võrdlus	MAP3K8	IL-6	MCP-1
ANOVA	Kõik proovid korraga	<0.0001	<0.0001	0.0121
Tukey	NS ++ NS vs NS ++ TNF- $\alpha$	<0,0001	0,0005	0,0368
	NS ++ NS vs TNF- $\alpha$ ++ NS	0,0091	0,1251	0,9980
	NS ++ NS vs TNF- $\alpha$ ++ TNF- $\alpha$	0,7157	0,0195	0,1334
	NS ++ TNF- $\alpha$ vs TNF- $\alpha$ ++ NS	<0,0001	<0,0001	0,0271
	NS ++ TNF- $\alpha$ vs TNF- $\alpha$ ++ TNF- $\alpha$	0,0004	0,1803	0,8701
	TNF- $\alpha$ ++ NS vs TNF- $\alpha$ ++ TNF- $\alpha$	0,0015	0,0003	0,1003

# LIHTLITSENTS

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Katrina Ahun

(sünnikuupäev: 28.02.1998)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose, „Geeniexpressiooni muutused fibroblastides tsütokiinide korduval toimel“ mille juhendajad on Epp Kaleviste ja Tõnis Org, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Katrina Ahun

**08.06.2019**